(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0119037
(43) 공개일자 2022년08월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01) *A61K 31/4709* (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C12Q 1/6886 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2022.01)
A61K 31/4709 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7021318
(22) 출원일자(국제) 2020년11월20일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년06월22일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2020/082974
(87) 국제공개번호 WO 2021/099612
국제공개일자 2021년05월27일
(30) 우선권주장
62/939,026 2019년11월22일 미국(US)

(71) 출원인
얀센 파마슈티카 엔.브이.
벨기에왕국 베-2340-비어세 투른호우트세베크 30
(72) 발명자
바비치, 알렉산더
미국 펜실베니아 19477 스프링 하우스 맥킨 로드 1400
발라수브라마니안, 스리람
미국 캘리포니아 92121 샌 디에고 메리필드 로우 3210
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한성

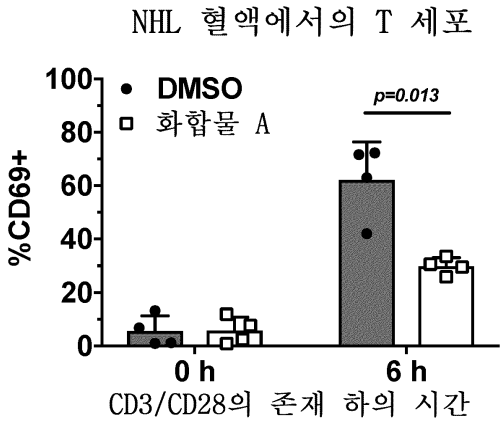
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 **MALT1 억제제의 효능 평가를 위한 NF-kB 조절 유전자 발현 분석**

(57) 요 약

인간 대상체에서 MALT1 억제제의 치료 효능을 결정하기 위한 방법 및 시약이 기재되어 있다. 상기 방법은 대상체로부터 획득된 혈액 샘플의 자극된 PBMC에서 MALT1 조절되는 유전자 발현을 결정하는 단계를 포함한다. 상기 방법은 MALT1 억제제 요법을 제공받는 대상체에 대한 치료 결정을 안내하기 위한 정보를 제공하고/하거나, 최적화 요법의 정확도를 개선하고/하거나, 독성을 감소시키고/시키거나, 치료적 치료(therapeutic treatment)의 효능을 모니터링한다.

대 표 도 - 도1b



(52) CPC특허분류
A61K 45/06 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C12Q 1/6886 (2022.01)
C12Q 2600/106 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
(72) 발명자
카오, 징
미국 펜실베니아 19477 스프링 하우스 맥킨 로드 1400
파울크, 브래들리 더블유.
미국 펜실베니아 19477 스프링 하우스 맥킨 로드 1400
호드킨슨, 브랜던
미국 펜실베니아 19477 스프링 하우스 맥킨 로드 1400
이작, 리아트
미국 펜실베니아 19477 스프링 하우스 맥킨 로드 1400
필리파르, 울리크
벨기에 비어스 비2340 투른호우트세베그 30
블로에만스, 넬레
벨기에 비어스 비2340 투른호우트세베그 30

명 세 서

청구범위

청구항 1

MALT1 억제제를 필요로 하는 대상체에서 상기 MALT1 억제제에 대한 반응을 예측하는 방법으로서,

(a) 상기 MALT1 억제제에 이전에 노출되었던 대상체의 시험 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계;

(b) 상기 MALT1 억제제에 이전에 노출되지 않았던 대상체의 대조 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계; 및

(c) (a)에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 (b)에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준과 비교하는 단계를 포함하며, 여기서 (a)에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준의 감소 또는 증가는 상기 대상체에서의 상기 MALT1 억제제에 대한 양성 반응으로 예측되는, 방법.

청구항 2

MALT1 억제제 요법을 필요로 하는 대상체에서 진행 중인 MALT1 억제제 요법의 효능을 모니터링하는 방법으로서,

(a) MALT1 억제제에 이전에 노출되었던 대상체의 시험 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계;

(b) MALT1 억제제에 이전에 노출되지 않았던 대상체의 대조 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계; 및

(c) (a)에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 (b)에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준과 비교하는 단계를 포함하며, 여기서 (a)에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준의 감소 또는 증가는 상기 대상체에서의 상기 MALT1 억제제 요법의 효능을 나타내는, 방법.

청구항 3

암 또는 MALT1-매개 질병의 치료를 필요로 하는 대상체에서 상기 암 또는 MALT1-매개 질병을 치료하는 방법으로서,

(a) MALT1 억제제에 이전에 노출되었던 대상체의 시험 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계;

(b) MALT1 억제제에 이전에 노출되지 않았던 대상체의 대조 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계;

(c) (a)에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 (b)에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준과 비교하는 단계; 및

(d) 상기 시험 샘플이 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준의 감소 또는 증가를 나타낸다면 상기 대상체에게 더 낮은 용량의 MALT1 억제제를 투여하고, 상기 시험 샘플이 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준의 감소 또는 증가를 나타내지 않는다면 상기 대상체에게 더 높은 용량의 MALT1 억제제를 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 4

암 또는 MALT1-매개 질병의 치료를 필요로 하는 대상체에서 상기 암 또는 MALT1-매개 질병을 치료하기 위한 약물 계획(drug regimen)을 설계하는 방법으로서,

(a) MALT1 억제제에 이전에 노출되었던 대상체의 시험 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계;

(b) MALT1 억제제에 이전에 노출되지 않았던 대상체의 대조 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수

준을 측정하는 단계;

(c) 상기 대상체의 시험 샘플에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 상기 대상체의 대조 샘플에서의 변화된 수준과 비교하는 단계; 및

(d) 상기 시험 샘플이 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준의 감소 또는 증가를 나타내지 않는다면 상기 대상체에게 제2 치료제를 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 5

암 또는 MALT1-매개 질병을 앓고 있는 대상체에서 MALT1 억제제의 용량 및/또는 투여 빈도를 변형시키는 방법으로서,

(a) 상기 MALT1 억제제에 이전에 노출되었던 대상체의 시험 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계;

(b) 상기 MALT1 억제제에 이전에 노출되지 않았던 대상체의 대조 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계;

(c) 상기 대상체의 시험 샘플에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 상기 대조 샘플의 변화된 수준과 비교하는 단계; 및

(d) 상기 시험 샘플이 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준의 감소 또는 증가를 나타낸다면, 상기 MALT1 억제제의 투여 빈도를 감소시키고, 상기 시험 샘플이 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준의 감소 또는 증가를 나타내지 않는다면, 상기 MALT1 억제제의 투여 빈도를 증가시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 6

제3항에 있어서, 상기 대상체의 시험 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계는,

a) 상기 시험 샘플의 제1 부분을 하나 이상의 자극제와 접촉시켜 자극된 시험 샘플을 획득하고, 상기 하나 이상의 자극제와 접촉되지 않은 상기 시험 샘플의 제2 부분을 비자극된 시험 샘플로서 유지하는 단계;

b) 상기 자극된 시험 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 제1 수준을 측정하는 단계;

c) 상기 비자극된 시험 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 제2 수준을 측정하는 단계로서, 상기 자극된 샘플로부터의 세포와 상기 비자극된 샘플로부터의 세포는 동일한 세포 유형을 갖는, 상기 단계; 및

d) MALT1 조절되는 유전자 발현의 제1 수준을 MALT1 조절되는 유전자 발현의 제2 수준과 비교함으로써 상기 시험 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 7

제3항에 있어서, 상기 대상체의 대조 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계는,

a) 상기 대조 샘플의 제1 부분을 하나 이상의 자극제와 접촉시켜 자극된 대조 샘플을 획득하고, 상기 하나 이상의 자극제와 접촉되지 않은 상기 대조 샘플의 제2 부분을 비자극된 대조 샘플로서 유지하는 단계;

b) 상기 자극된 대조 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 제3 수준을 측정하는 단계;

c) 상기 비자극된 대조 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 제4 수준을 측정하는 단계로서, 상기 자극된 샘플로부터의 세포와 상기 비자극된 샘플로부터의 세포는 동일한 세포 유형을 갖는, 상기 단계; 및

d) MALT1 조절되는 유전자 발현의 제3 수준을 MALT1 조절되는 유전자 발현의 제4 수준과 비교함으로써 상기 대조 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 8

제3항에 있어서, 상기 암은 비호지킨 림프종, 미만성 거대 B-세포 림프종(DLBCL), 외투 세포 림프종(MCL), 여포성 림프종(FL), 점막-관련 림프 조직(MALT) 림프종, 변연부 림프종, T-세포 림프종, 호지킨 림프종, 버킷 림프종, 다발성 골수종, 만성 림프구성 백혈병(CLL), 림프아구성 T 세포 백혈병, 만성 골수원성 백혈병(CML), 소림프구성 림프종(SLL), 발덴스트룀 거대글로불린혈증, 림프아구성 T 세포 백혈병, 만성 골수원성 백혈병(CML), 모

발상-세포 백혈병, 급성 림프아구성 T 세포 백혈병, 형질세포종, 면역아구성 대세포 백혈병, 거핵아구성 백혈병, 급성 거핵구성 백혈병, 전골수구성 백혈병, 적백혈병, 뇌(신경교종), 교아세포종, 유방암, 결직장암/결장암, 전립선암, 비소세포 폐암을 포함한 폐암, 위암, 자궁내막암, 흑색종, 췌장암, 간암, 신장암, 편평 세포암종, 난소암, 육종, 골육종, 갑상선암, 방광암, 두경부암, 고환암, 유잉 육종, 횡문근육종, 수아세포종, 신경아세포종, 자궁경부암, 신세포암(renal cancer), 요로상피암, 외음부암, 식도암, 타액선암, 비인두암, 볼암(buccal cancer), 구강암(cancer of the mouth), 및 GIST(위장관 간질 종양)로부터 선택되는, 방법.

청구항 9

제3항에 있어서, 상기 MALT1-매개 질병은 관절염, 염증성 장 질병, 위염, 강직성 척추염, 궤양성 결장염, 췌장염, 크론병, 셀리악병, 다발성 경화증, 전신 홍반성 루푸스, 루푸스 신염, 류머티스성 열, 통풍, 기관 이식 거부반응, 만성 동종이식편 거부반응, 급성 또는 만성 이식편-대-숙주 질병, 아토피성 피부염을 포함한 피부염, 피부근염, 건선, 베체트병, 포도막염, 중증 근무력증, 그레이브스병, 하시모토 갑상선염, 쇼그렌 증후군, 수포성 장애, 항체-매개 혈관염 증후군, 면역-복합체 혈관염, 알레르기성 장애, 천식, 기관지염, 만성 폐색성 폐 질병(COPD), 낭포성 섬유증, 폐렴, 부종, 색전증, 섬유증, 사르코이드증, 고혈압 및 기종을 포함한 폐 질병, 규폐증, 호흡 부전, 급성 호흡곤란 증후군, BENTA 질병, 베릴륨 중독, 및 다발성 근염으로부터 선택되는 면역학적 질병인, 방법.

청구항 10

제6항에 있어서, 상기 하나 이상의 자극제는 IL-1α, IL-1β, TNF-α, 지질다당류(LPS), 외독소 B, 포르볼 미리스테이트 아세테이트(PMA)/이오노마이신, TLR 효능제(agonist), 항-CD3 항체, 항-CD8 항체, 항-IgM 항체, 및 이들의 조합으로부터 선택되는, 방법.

청구항 11

제6항에 있어서, 상기 시험 샘플 또는 상기 대조 샘플은 약 1 내지 12시간, 약 1 내지 10시간, 약 1 내지 9시간, 또는 약 1 내지 8시간 동안 상기 자극제들 중 하나 이상과 접촉되는, 방법.

청구항 12

제6항에 있어서, 상기 대상체의 샘플에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현은 RNA 서열분석 검정, 유전자 발현 마이크로어레이, 또는 정량적 역전사 폴리머라제 연쇄 반응 검정(qRT-PCR)에 의해 측정되는, 방법.

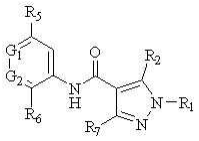
청구항 13

제4항에 있어서, 상기 제2 치료제는 BTK(브루톤 티로신 키나제) 억제제, SYK 억제제, PKC 억제제, PI3K 경로 억제제, BCL 패밀리 억제제, JAK 억제제, PIM 키나제 억제제, B 세포 항원-결합 항체, 항-PD1 항체, 항-PD-L1 항체, 및 이들의 조합으로부터 선택되는, 방법.

청구항 14

제3항에 있어서, 상기 MALT1 억제제는 화학식 (I)의 화합물, 또는 이의 거울상 이성질체, 부분입체 이성질체, 용매화물, 또는 약제학적으로 허용되는 염 형태인, 방법:

[화학식 (I)]



(상기 식에서,

R_1은

i) 플루오로 또는 아미노 치환체로 선택적으로 치환된 나프탈렌-1-일; 및

ii) O, N, 및 S로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 함유하되, 1개의 헤테로원자만이 O

또는 S가 되는 9원 또는 10원 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되며; 여기서, ii)의 상기 헤테로아릴은 독립적으로 중수소, 메틸, 에틸, 프로필, 아이소프로필, 트라이플루오로메틸, 사이클로프로필, 메톡시메틸, 다이플루오로메틸, 1,1-다이플루오로에틸, 하이드록시메틸, 1-하이드록시에틸, 1-에톡시에틸, 하이드록시, 메톡시, 에톡시, 플루오로, 클로로, 브로모, 메틸티오, 시아노, 아미노, 메틸아미노, 다이메틸아미노, 4-옥소테트라하이드로푸란-2-일, 5-옥소피롤리딘-2-일, 1,4-다이옥사닐, 아미노카르보닐, 메틸카르보닐, 메틸아미노카르보닐, 옥소, 1-(t-부톡시카르보닐)아제티딘-2-일, N-(메틸)포름아미도메틸, 테트라하이드로푸란-2-일, 3-하이드록시-피롤리딘-1-일, 피롤리딘-2-일, 3-하이드록시아제티디닐, 아제티딘-3-일, 또는 아제티딘-2-일로부터 선택되는 1개 또는 2개의 치환체로 선택적으로 치환되고;

R_2는 C_{1-4}알킬, 1-메톡시-에틸, 다이플루오로메틸, 플루오로, 클로로, 브로모, 시아노, 및 트라이플루오로메틸로 이루어진 군으로부터 선택되고;

G_1은 N 또는 C(R_4)이고;

G_2는 N 또는 C(R_3)이되, 어느 경우에도 G_1 및 G_2 중 하나만이 N이 되고;

R_3은 독립적으로 트라이플루오로메틸, 시아노, C_{1-4}알킬, 플루오로, 클로로, 브로모, 메틸카르보닐, 메틸티오, 메틸설피닐, 및 메탄설포닐로 이루어진 군으로부터 선택되거나; 또는, G_1이 N일 때, R_3은 추가로 C_{1-4}알콕시카르보닐로부터 선택되고;

R_4는

i) G_2가 N일 때, 수소;

ii) C_{1-4}알콕시;

iii) 시아노;

iv) 사이클로프로필옥시;

v) 트라이아졸릴, 옥사졸릴, 아이소옥사졸릴, 피라졸릴, 피롤릴, 티아졸릴, 테트라졸릴, 옥사다이아졸릴, 이미다졸릴, 2-아미노-피리미딘-4-일, 2H-[1,2,3]트라이아졸로[4,5-c]피리딘-2-일, 2H-[1,2,3]트라이아졸로[4,5-b]피리딘-2-일, 3H-[1,2,3]트라이아졸로[4,5-b]피리딘-3-일, 1H-[1,2,3]트라이아졸로[4,5-c]피리딘-1-일로 이루어진 군으로부터 선택되는 헤테로아릴 - 여기서, 상기 헤테로아릴은 옥소, C_{1-4}알킬, 카르복시, 메톡시카르보닐, 아미노카르보닐, 하이드록시메틸, 아미노메틸, (다이메틸아미노)메틸, 아미노, 메톡시메틸, 트라이플루오로메틸, 아미노(C_{2-4}알킬)아미노, 또는 시아노로부터 독립적으로 선택되는 1개 또는 2개의 치환체로 선택적으로 치환됨 -;

vi) 1-메틸-피페리딘-4-일옥시;

vii) 4-메틸-피페라진-1-일카르보닐;

viii) (4-아미노부틸)아미노카르보닐;

ix) (4-아미노)부톡시;

x) 4-(4-아미노부틸)-피페라진-1-일카르보닐;

xi) 메톡시카르보닐;

xii) 5-클로로-6-(메톡시카르보닐)피리딘-3-일아미노카르보닐;

xiii) 1,1-다이옥소-아이소티아졸리딘-2-일;

xiv) 3-메틸-2-옥소-2,3-다이하이드로-1H-이미다졸-1-일;

xv) 2-옥소피롤리딘-1-일;

xvi) (*E*)- (4-아미노부트-1-엔-1-일-아미노카르보닐;

xvii) 다이플루오로메톡시; 및

xviii) 모르폴린-4-일카르보닐로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R_5는 독립적으로 수소, 클로로, 플루오로, 브로모, 메톡시, 메틸설포닐, 시아노, C_{1-4}알킬, 에티닐, 모르폴린-4-일, 트라이플루오로메틸, 하이드록시에틸, 메틸카르보닐, 메틸설피닐, 3-하이드록시-피롤리딘-1-일, 피롤리딘-2-일, 3-하이드록시아제티디닐, 아제티딘-3-일, 아제티딘-2-일, 메틸티오, 및 1,1-다이플루오로에틸로 이루어진 군으로부터 선택되거나;

또는 R_4와 R_5는 함께 결합되어 8-클로로-4-메틸-3-옥소-3,4-다이하이드로-*2H*-벤조[*b*][1,4]옥사진-6-일, 8-클로로-3-옥소-3,4-다이하이드로-*2H*-벤조[*b*][1,4]옥사진-6-일, 2-메틸-1-옥소-1,2,3,4-테트라하이드로아이소퀴놀린-7-일, 4-메틸-3-옥소-3,4-다이하이드로-2H-벤조[b][1,4]옥사진-6-일, 3-옥소-3,4-다이하이드로-2H-벤조[b][1,4]옥사진-6-일, 1-메틸-1H-피라졸로[3,4-b]피리딘-5-일, 1H-피라졸로[3,4-b]피리딘-5-일, 2,3-다이하이드로-[1,4]다이옥시노[2,3-b]피리딘-5-일, 1,3-다이옥솔로[4,5]피리딘-5-일, 1-옥소-1,3-다이하이드로아이소벤조푸란-5-일, 2,2-다이메틸벤조[d][1,3]다이옥솔-5-일, 2,3-다이하이드로벤조[b][1,4]다이옥신-6-일, 1-옥소아이소인돌린-5-일, 또는 2-메틸-1-옥소아이소인돌린-5-일, *1H*-인다졸-5-일을 형성할 수 있고;

R_6은 수소, C_{1-4}알킬, 플루오로, 2-메톡시-에톡시, 클로로, 시아노 또는 트라이플루오로메틸이고;

R_7은 수소 또는 플루오로이되;

단, 화학식 (I)의 화합물은 하기 화합물 이외의 것임:

R_1이 아이소퀴놀린-8-일이고, R_2가 트라이플루오로메틸이고, G_1이 C(R_4)(여기서, R_4는 *2H*-1,2,3-트라이아졸-2-일임)이고, G_2가 N이고, R_5가 수소인 화합물;

R_1이 아이소퀴놀린-8-일이고, R_2가 트라이플루오로메틸이고, G_1이 C(R_4)(여기서, R_4는 *1H*-이미다졸-1-일임)이고, G_2가 N이고, R_5가 클로로인 화합물;

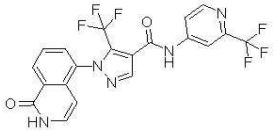
R_1이 아이소퀴놀린-8-일이고, R_2가 트라이플루오로메틸이고, G_1이 C(R_4)(여기서, R_4는 *1H*-1,2,3-트라이아졸-1-일임)이고, G_2가 N이고, R_5가 수소인 화합물;

R_1이 아이소퀴놀린-8-일이고, R_2가 트라이플루오로메틸이고, G_1이 C(R_4)(여기서, R_4는 수소임)이고, G_2가 N이고, R_5가 플루오로인 화합물).

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 MALT1 억제제는 화학식 (II)로 나타낸 1-(1-옥소-1,2 다이하이드로아이소퀴놀린-5-일)-5(트라이플루오로메틸)-N-[2 (트라이플루오로메틸)피리딘-4-일]-1H-피라졸-4 카르복스아미드, 또는 이의 용매화물, 호변이성질체, 또는 약제학적으로 허용되는 염인, 방법:

[화학식 (II)]



.

청구항 16

대상체에서 암 또는 MALT1-매개 질병을 치료하는 방법으로서,

a) 대상체의 시험 혈액 샘플의 제1 부분을 하나 이상의 자극제와 접촉시켜 자극된 샘플을 획득하고, 상기 하나 이상의 자극제와 접촉되지 않은 대상체의 시험 혈액 샘플의 제2 부분을 비자극된 샘플로서 유지하는 단계로서, 상기 시험 혈액 샘플은 MALT1 억제제에 이전에 노출되었던, 상기 단계;

b) 상기 자극된 샘플의 PBMC에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 제1 수준을 측정하는 단계;

c) 상기 비자극된 샘플의 PBMC에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 제2 수준을 측정하는 단계로서, 상기 비자극

된 샘플 내의 PBMC와 상기 자극된 샘플 내의 PBMC는 동일한 세포 유형을 갖는, 상기 단계;

d) 상기 제1 수준을 상기 제2 수준과 비교하여 상기 시험 혈액 샘플에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 얻는 단계;

e) 상기 시험 혈액 샘플에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 대조 혈액 샘플에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준과 비교하는 단계, 및

f) 상기 시험 샘플이 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준의 감소 또는 증가를 나타내지 않는다면, 상기 대상체에게 MALT1 억제제의 용량을 약 1 mg 내지 약 1000 mg으로 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 17

암 또는 MALT1-매개 질병을 앓고 있는 대상체에서 MALT1 억제제의 용량 및/또는 투여 빈도를 변형시키는 방법으로서,

a) 대상체의 시험 혈액 샘플의 제1 부분을 하나 이상의 자극제와 접촉시켜 자극된 샘플을 획득하고, 상기 하나 이상의 자극제와 접촉되지 않은 대상체의 시험 혈액 샘플의 제2 부분을 비자극된 샘플로서 유지하는 단계로서, 상기 시험 혈액 샘플은 MALT1 억제제에 이전에 노출되었던, 상기 단계;

b) 상기 자극된 샘플의 PBMC에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 제1 수준을 측정하는 단계;

c) 상기 비자극된 샘플의 PBMC에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 제2 수준을 측정하는 단계로서, 상기 비자극된 샘플 내의 PBMC와 상기 자극된 샘플 내의 PBMC는 동일한 세포 유형을 갖는, 상기 단계;

d) 상기 제1 수준을 상기 제2 수준과 비교하여 상기 시험 혈액 샘플에서의 NF-κB 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 얻는 단계;

e) 상기 시험 혈액 샘플에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 대조 혈액 샘플에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준과 비교하는 단계, 및

f) 상기 시험 샘플이 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준의 감소 또는 증가를 나타내지 않는다면, 상기 대상체에게 MALT1 억제제의 유효량을 약 1 mg/일 내지 약 1000 mg/일로 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 18

제16항에서 있어서, 상기 MALT1 조절되는 유전자 발현을 측정하는 단계는 IL2, TNFRSF18, CD40LG, ICOS, CCL4, CTLA4, CCL20, CCL1, TNFRSF4, CCL3L1, IL6, CCL3, TNF, IL4, FEZ1, LTA, IL9, IFNG, IL3, IL1A, CCL8, CD163, CSF2, MRC1, IL22, IL13, POU2F2, CCR4, IL19, ADA, 및 PECAM1로부터 선택되는 유전자들 중 하나 이상의 발현을 측정하는 단계를 포함하는, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원과의 상호 참조

[0002] 본 출원은 2019년 11월 22일자로 출원된 미국 가출원 제62/939,026호에 대한 우선권을 주장하며, 이 출원의 개시내용은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0003] 기술분야

[0004] 본 출원은 MALT1(mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation 1, 점막-관련 림프 조직 림프종 전좌 1) 조절되는 유전자 발현 검정 및 MALT1 억제제의 효능을 예측하고 대상체에서의 치료 방법을 설계하는 데 있어서의 그러한 검정의 용도에 관한 것이다. 구체적으로는, 본 출원은 대상체의 자극된 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)에서 MALT1 조절되는 유전자의 발현을 측정함으로써 대상체에서의 MALT1 억제제의 약력학적 효과를 평가하기 위한 유전자 발현 검정에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0005] 핵 인자-카파B 전사 인자(NF-κB) 복합체는 세포 증식, 생존 및 약물 저항성에서 중요한 유전자를 조절한다.

포유동물에서의 NF-κB 전사 인자 패밀리는 5가지의 단백질, 즉, p50, p52, p65, Rel-B 및 c-Rel로 이루어지며, 이들은 서로 회합되어 별개의 전사적으로 활성인 동종이량체 및 이종이량체 복합체를 형성한다. 비자극된 세포에서, NF-κB 복합체는 κB의 억제인자(IκB)에 의해 혈장에서 비활성화된 상태로 유지된다. 통상 세포의 외부로부터 유래되는 신호에 의해 활성화될 때, IκB 키나제(IKK)는 IκB를 인산화하며, 이는 IκB의 분해, 및 핵에 대한 전좌 및 표적 유전자의 활성화를 위한 NF-κB 복합체의 방출로 이어진다. NF-κB 복합체의 핵 전좌는 특정 표적 유전자의 전사적 활성화에 대한 세포외 자극의 커플링에 있어서 중요한 단계이다.

[0006] 상이한 유형의 B-세포 비호지킨 림프종(NHL) 및 만성 림프구성 백혈병(CCL)과 같은 많은 질병의 발병기전에 대해 NF-κB 경로의 비정상적인 활성이 불가피한 것으로 알려져 있다. NF-κB 신호전달의 구성적 활성화는 더 공격적인 형태의 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL)인 활성화된 B 세포-유사 아형의 미만성 거대 B 세포 림프종(ABC-DLBCL)의 특징이다. DLBCL은 림프종 사례의 대략 25%를 차지하는 비호지킨 림프종(NHL)의 가장 일반적인 형태이며, 한편 ABC-DLBCL은 DLBCL의 대략 40%를 구성한다. NF-κB 경로 활성화는 ABC-DLBCL 환자에서 신호전달 성분의 돌연변이, 예컨대 CD79A, CD79B, CARD11, MYD88 및 A20의 하나 이상의 유전자에서의 돌연변이에 의해 유도될 수 있다.

[0007] MALT1(점막-관련 림프 조직 림프종 전좌 1)은 고전적인 NF-κB 신호전달 경로의 주요 매개체이다. MALT1은 다음 2가지 기전에 의해 NF-κB 신호전달에 영향을 준다: (1) MALT1이 스캐폴딩 단백질로서 기능하고 NF-κB 신호전달 단백질, 예컨대 TRAF6, TAB-TAK1 또는 NEMO-IKKα/β를 동원하는 기전; 및 (2) MALT1이 시스테인 프로테아제로서 NF-κB 신호전달의 음의 조절인자, 예컨대 RelB, A20 또는 CYLD를 절단하고, 그럼으로써 비활성화시키는 기전. MALT1 활성의 최종 종점은 NF-κB 전사 인자 복합체의 핵 전좌 및 NF-κB 신호전달의 활성화이다.

[0008] API2-MALT1 발암단백질은 NF-κB 경로의 잠재적인 활성화 인자이다. 이는 MALT1의 카르복시 말단에 융합된 아폽토시스 2의 억제인자(API2 또는 cIAP2)의 아미노 말단을 포함하고, MALT 림프종에서 염색체 전좌에 의해 생성된다. API2-MALT1은 리간드-결합된 TNF 수용체를 모방하고, 표준 NF-κB 신호전달을 활성화시키기 위한 스캐폴드로서 작용하는 RIP1의 TRAF2-의존성 유비퀴틴화를 촉진시킨다. 더욱이, API2-MALT1은 NF-κB-유도성 키나제(NIK)를 절단하여 이의 안정하고 구성적으로 활성인 단편을 생성하고, 그럼으로써 비표준 NF-κB 경로를 활성화시키는 것으로 밝혀져 있다.

[0009] MALT1 억제는 1) 대안적인 경로 억제 투약제에 저항성을 나타내는 종양을 갖는 참가자에서 NF-κB 활성의 억제를 가능하게 할 수 있고, 2) 다른 NF-κB 억제제와 병용될 때 억제를 증강시킬 수 있고, 3) 소정의 유전자적 돌연변이를 갖는 악성종양에서 살종양성(tumoricidal)일 수 있는 것으로 여겨진다. BTK 억제제, 예를 들어 이브루티닙의 사용은, ABC-DLBCL에서의 NF-κB 신호전달을 억제하는 것이 효능이 있다는 임상적 개념 증명(proof-of-concept)을 제공한다. MALT1은 NF-κB 신호전달 경로에서 BTK의 하류에 있고, MALT1 억제제는 이브루티닙에 반응하지 않는 ABC-DLBCL 환자, 예컨대 CARD11 돌연변이를 갖는 환자를 표적으로 할 수 있을 뿐만 아니라, 이브루티닙에 대한 저항성을 획득한 환자를 치료할 수도 있다. MALT1의 소분자 억제제는 ABC-DLBCL의 전임상 모델에서 효능을 입증하였다.

[0010] 림프종 이외에도, MALT1은 또한 선천 면역 및 적응 면역에서 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀져 있다. 연구는 MALT1을 억제하는 것이 자가면역 질병을 치료하는 데 도움이 될 수 있음을 시사하였다. 예를 들어, MALT1 프로테아제 활성의 약리학적 억제는 다발성 경화증의 마우스 모델에서 마우스를 보호하는 것으로 보고되었다.

[0011] MALT1 억제제(MI-2)는 CLL 세포에서 NF-κB 단백질의 핵 전좌를 억제하는 것으로 밝혀졌다. 이 검정은 효소-결합 면역흡착 검정(ELISA)을 통해, 시험관내(*in vitro*)에서 MALT1 억제제로 처리된 CLL 세포에서 NF-κB 단백질(p50 및 RelB)의 핵 수준을 측정함으로써 수행되었다. MALT1 억제제(MI-2)는 또한, 정량적 RT-PCR에 의해 측정된 바와 같이, 시험관내에서 MALT1 억제제로 처리된 CLL 세포에서 6가지의 알려진 NF-kB 표적 유전자(CCND2, BCL2A, CCL3, CCL4, RGS1, 및 TNF)의 발현을 유의하게 감소시키는 것으로 밝혀졌다. MALT1 억제제에 의한 처리는 시험된 2가지의 ABC DLBCL 주(line)에서 NF-κB 표적 유전자 시그너처의 유의한 감소를 나타내었다. 그러나, 임상과 관련하여, 정상 세포에 비하여 적은 수의 종양 세포 및 암 세포의 이질성을 고려하면, NF-κB의 핵 전좌의 검출 또는 종양 세포에서의 NF-kB 표적 유전자 발현의 측정은 큰 난제를 제시한다.

[0012] 임상과 관련하여 MALT1 억제제의 약력학적 효과를 평가하고, 대상체가 MALT1 억제제 치료에 반응하는지의 여부를 결정하기 위한 재현가능하고 비교적 저비용의 방법에 대한 필요성이 있다.

발명의 내용

[0013] 본 출원은 대상체의 샘플에서 MALT1 의존성 유전자 발현을 측정함으로써 MALT1 억제제의 약력학적 효과를 평가

하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 MALT1 억제제에 노출된 대상체의 세포에서 MALT1 조절되는 유전자들 중 어느 하나의 수준을 결정하는 단계를 포함한다. 본 명세서에 개시된 방법은 MALT1-매개 질병, 예컨대 림프종 또는 자가면역 질병의 치료를 필요로 하는 대상체에서 MALT1 억제제에 대한 반응을 결정하거나 예측하는 데 사용될 수 있다. 그러한 바와 같이, 본 출원의 방법은 MALT1 억제제에 반응하는 대상체를 확인하고/하거나, MALT1 억제제 요법을 제공받는 대상체에 대한 치료 결정을 안내하고/하거나, 진행 중인 MALT1 억제제 요법의 효능을 모니터링하기 위한 정보를 제공한다.

[0014] 본 출원의 일반적인 일 태양에서, 대상체에서 MALT1 억제제에 대한 반응을 예측하는 방법은 (a) MALT1 억제제에 이전에 노출되었던 대상체의 시험 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계; (b) MALT1 억제제에 이전에 노출되지 않았던 대상체의 대조 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 대상체의 시험 샘플에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 상기 대조 샘플에서의 변화된 수준과 비교하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 시험 샘플에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준의 감소 또는 증가는 상기 대상체에서의 상기 MALT1 억제제에 대한 양성 반응으로 예측된다.

[0015] 다른 실시 형태에서, 대상체에서 진행 중인 MALT1 억제제 요법의 효능을 모니터링하는 방법은 (a) MALT1 억제제에 이전에 노출되었던 대상체의 시험 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계; (b) MALT1 억제제에 이전에 노출되지 않았던 대상체의 대조 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 대상체의 시험 샘플에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 상기 대조 샘플에서의 변화된 수준과 비교하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 시험 샘플에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준의 감소 또는 증가는 상기 대상체에서의 MALT1 억제제 요법의 효능을 나타낸다.

[0016] 다른 실시 형태에서, 대상체에서 암 또는 MALT1-매개 질병을 치료하는 방법은 (a) MALT1 억제제에 이전에 노출되었던 대상체의 시험 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계; (b) MALT1 억제제에 이전에 노출되지 않았던 대상체의 대조 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계; (c) 상기 대상체의 시험 샘플에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 상기 대조 샘플에서의 변화된 수준과 비교하는 단계; 및 (d) 상기 시험 샘플이 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준의 감소 또는 증가를 나타낸다면 상기 대상체에게 더 낮은 용량의 MALT1 억제제를 투여하고, 상기 시험 샘플이 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준의 감소 또는 증가를 나타내지 않는다면 상기 대상체에게 더 높은 용량의 MALT1 억제제를 투여하는 단계를 포함한다.

[0017] 다른 실시 형태에서, 대상체에서 암 또는 MALT1-매개 질병을 치료하는 방법은 (a) MALT1 억제제에 이전에 노출되었던 대상체의 시험 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계; (b) MALT1 억제제에 이전에 노출되지 않았던 대상체의 대조 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계; (c) 상기 대상체의 시험 샘플에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 상기 대조 샘플에서의 변화된 수준과 비교하는 단계; 및 (d) 상기 시험 샘플이 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준의 감소 또는 증가를 나타낸다면 상기 대상체에게 MALT1 억제제의 유효량을 투여하는 단계를 포함한다.

[0018] 다른 실시 형태에서, 대상체에서 암 또는 MALT1-매개 질병을 치료하기 위한 약물 계획을 설계하는 방법은 (a) MALT1 억제제에 이전에 노출되었던 대상체의 시험 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계; (b) MALT1 억제제에 이전에 노출되지 않았던 대상체의 대조 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계; (c) 상기 대상체의 시험 샘플에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 상기 대조 샘플에서의 변화된 수준과 비교하는 단계; 및 (d) 상기 시험 샘플이 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준의 감소 또는 증가를 나타내지 않는다면 상기 대상체에게 제2 치료제를 투여하는 단계를 포함한다.

[0019] 다른 실시 형태에서, 암 또는 MALT1-매개 질병을 앓고 있는 대상체에서 MALT1 억제제의 용량 및/또는 투여 빈도를 변형시키는 방법은 (a) MALT1 억제제에 이전에 노출되었던 대상체의 시험 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계; (b) MALT1 억제제에 이전에 노출되지 않았던 대상체의 대조 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계; (c) 상기 대상체의 시험 샘플에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 상기 대조 샘플의 변화된 수준과 비교하는 단계; 및 (d) 상기 시험 샘플이 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준의 감소 또는 증가를 나타낸다면, 상기 MALT1 억제제의 투여 빈도를 감소시키고, 상기 시험 샘플이 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준의 감소 또는 증가를 나타내지 않는다면, MALT1 억제제의 투여 빈도를 증가시키는 단계를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0020] 전술한 개요뿐만 아니라, 본 출원의 바람직한 실시 형태의 하기의 상세한 설명도 첨부 도면과 함께 읽을 때 더 잘 이해될 것이다. 그러나, 본 출원은 도면에 나타낸 정확한 실시 형태로 제한되지 않음이 이해되어야 한다.

도 1a 및 도 1b는 대조군(DMSO) 대비 화합물 A로 처리된 세포에서 항-CD3 및 항-CD-28 항체에 의한 자극 시에 시간 경과에 따라 CD69를 발현하는 정상 혈액(도 1a) 또는 NHL 혈액(도 1b)에서의 T 세포의 백분율을 보여주는 그래프를 나타낸다.

도 2는 증가하는 농도의 화합물 A로 처리된 NHL 혈액 샘플 내의 p50(NF-κB의 하위단위)의 핵 풍부화를 갖는 총 T 세포의 빈도의 배수 변화(fold change)를 보여주는 그래프이다.

도 3은 대조군(DMSO) 대비 화합물 A로 처리된, 비자극된 B 세포 및 항-IgM 자극된 B 세포에서의 p50 핵 지수를 보여주는 그래프를 나타낸다.

도 4는 대조군(DMSO) 대비 화합물 A로 처리된, 비자극된 세포 및 항-IgM 자극된 세포에서, CLL B 세포에서의 핵 p50의 백분율을 보여주는 그래프를 나타낸다.

도 5는 대조군(DMSO) 대비 화합물 A로 처리된, 비자극된 세포 및 항-IgM 자극된 세포에서, CLL T 세포에서의 핵 p50의 백분율을 보여주는 그래프를 나타낸다.

도 6a 및 도 6b는 화합물 A로 처리된 NHL(도 6a) 및 CLL(도 6b) 공여자 샘플에서의 CXCL10 발현 수준을 보여주는 그래프를 나타낸다.

도 7은 화합물 A로 처리된 NHL 공여자 샘플로부터의 정제된 T-세포 및 정제된 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)에서의 IL2 발현 수준을 보여주는 그래프를 나타낸다.

도 8a 내지 도 8d는 화합물 A로 처리된 NHL 공여자 샘플로부터의 정제된 PBMC 및 비자극된 PBMC에서의 NF-kB2(도 8a), TNFSF10(도 8b), APOE(도 8c), 및 PYCARD(도 8d) 발현 수준을 보여주는 그래프를 나타낸다.

도 9a 내지 도 9d는 상이한 자극제에 의한 생체외 자극 시에 NHL을 갖는 공여자의 말초 혈액으로부터의 T 세포에서의 NF-kB 전좌를 보여주는 그래프를 나타낸다: NF-kB 핵 전좌에 대한 T 세포에서의 핵 지수는 항-CD3 및 항-CD28 항체(도 9a) 및 포르볼 미리스테이트 아세테이트(PMA)/이오노마이신(도 9b)로 자극된, DMSO(대조군)로 처리된 대조 혈액 샘플 및 화합물 A(화합물 A)로 처리된 시험 혈액 샘플에서의 T 세포에 대해, 비자극된 샘플에서의 기저선 수준(NF-kB Δ핵 지수)에 대해 보정되었고; 화합물 A 처리된 샘플에서의 NF-kB Δ핵 지수의 평균값을 대조군에 대해 정규화하고, 항-CD3 및 항-CD28 항체(도 9c) 및 포르볼 미리스테이트 아세테이트(PMA)/이오노마이신(도 9d)에 의해 자극된 샘플에 대한 억제의 백분율로 표현하였다. 도 9c 및 도 9d에서의 데이터는 평균 및 평균의 표준 오차이다.

정의

다양한 간행물, 논문, 및 특허가 배경기술에 그리고 본 명세서 전체에 걸쳐 인용되어 있거나 기재되어 있으며; 이들 참고문헌 각각은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다. 본 명세서에 포함된 문헌, 행동, 재료, 장치, 물품 등에 대한 논의는 본 발명에 대한 상황을 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러한 논의는 이들 대상 중 임의의 것 또는 모든 것이 개시되거나 청구된 임의의 발명에 대하여 종래 기술의 일부를 형성하는 것을 인정하는 것은 아니다.

달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 그렇지 않으면, 본 명세서에 사용되는 소정의 용어는 본 명세서에 제시된 바와 같은 의미를 갖는다.

본 명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용되는 바와 같이, 단수 형태(부정 관사 및 정관사)는, 문맥이 명확하게 달리 지시하지 않으면, 복수의 지시 대상을 포함한다는 것에 유의해야 한다.

본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "약"은 당업자에 의해 결정된 바와 같은 특정 값이 허용되는 오차 범위 내에 있음을 의미하며, 이는 어떻게 그 값이 측정 또는 결정되는지, 즉 측정 시스템의 제한사항에 부분적으로 좌우될 것이다. 특정 검정, 결과 또는 실시 형태와 관련하여 실시예에서 또는 명세서에서의 어딘가 다른 곳에서 달리 명시적으로 언급되지 않는 한, "약"은 당업계의 관행에 따른 1 표준 편차, 또는 최대 10%의 범위 어느 쪽이든 더 큰 값 이내에 있음을 의미한다.

본 명세서에 사용되는 바와 같이, 다수의 언급된 요소들 사이의 접속 용어 "및/또는"은 개별 선택지 및 조합된 선택지 둘 모두를 포함하는 것으로 이해된다. 예를 들어, 2개의 요소들이 "및/또는"에 의해 결합되는 경우, 제1 선택지는 제2 요소 없이 제1 요소의 적용가능성을 지칭한다. 제2 선택지는 제1 요소 없이 제2 요소의 적용가능성을 지칭한다. 제3 선택지는 제1 요소와 제2 요소가 함께 적용가능함을 지칭한다. 이들 선택지 중 어느 것이든 하나는 이 의미 내에 속하는 것으로 이해되며, 이에 따라 본 명세서에 사용되는 바와 같이 용어 "및/또는"의 요건을 충족시킨다. 이들 선택지 중 하나 초과의 동시 적용가능성 또한 이 의미 내에 속하는 것으로 이해되며, 이에 따라 용어 "및/또는"의 요건을 충족시킨다.

본 명세서에 사용되는 바와 같이, 일련의 요소 앞의 용어 "적어도"는 일련 내의 각각의 모든 요소를 지칭하는 것으로 이해되어야 한다. 당업자는 단지 일반적인 실험을 사용하여, 본 명세서에서 설명된 본 발명의 구체적인 실시 형태에 대한 많은 등가물을 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 그러한 등가물은 본 발명에 의해 포함되도록 의도된다.

본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "포함하다", "포함하는", "구비하다", "구비하는", "갖는다", "갖는", "함유하다" 또는 "함유하는", 또는 이들의 임의의 다른 변형은 언급된 정수 또는 정수들의 군의 포함을 내포하지만 임의의 다른 정수 또는 정수들의 군의 배제를 내포하지 않는 것으로 이해될 것이며, 비배타적 또는 개방형(open-ended)인 것으로 의도된다. 예를 들어, 요소들의 목록을 포함하는 조성물, 혼합물, 공정, 방법, 물품, 또는 장치는 반드시 그러한 요소들만으로 제한되지는 않고, 그러한 조성물, 혼합물, 공정, 방법, 물품, 또는 장치에 고유하거나 명시적으로 열거되어 있지 않은 다른 요소들을 포함할 수 있다. 또한, 명시적으로 반대로 기재되어 있지 않는 한, "또는"은 배타적 '또는'이 아니라 포괄적 '또는'을 지칭한다. 예를 들어, 조건 A 또는 B는 하기 중 어느 하나에 의해 만족된다: A가 참(또는 존재함)이고 B가 거짓(또는 존재하지 않음)임, A가 거짓(또는 존재하지 않음)이고 B가 참(또는 존재함)임, A 및 B 둘 모두가 참(또는 존재함)임.

본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "~로 이루어진다", 또는 변형, 예컨대 "~로 이루어지다" 또는 "~로 이루어진"은, 본 명세서 및 청구범위 전체에 걸쳐 사용되는 바와 같이, 임의의 언급된 정수 또는 정수들의 군의 포함을 나타내지만, 추가의 정수 또는 정수들의 군이 명시된 방법, 구조, 또는 조성물에 추가될 수 없다.

본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "~로 본질적으로 이루어진다", 또는 변형, 예컨대 "~로 본질적으로 이루어지다" 또는 "~로 본질적으로 이루어진"은, 본 명세서 및 청구범위 전체에 걸쳐 사용되는 바와 같이, 임의의 언급된 정수 또는 정수들의 군의 포함, 및 명시된 방법, 구조 또는 조성물의 기본적 또는 신규한 특성을 실질적으로 변화시키지 않는 임의의 언급된 정수 또는 정수들의 군의 선택적인 포함을 나타낸다. 문헌[M.P.E.P. § 2111.03]을 참조한다.

본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "MALT1 조절되는 유전자 발현"은 하류 NF-kB에 의해 조절되는 유전자, 및 NF-kB와 독립적으로 조절되는 유전자를 포함한, MALT1에 의해 상향조절 또는 하향조절되는 임의의 유전자를 포함한다.

본 명세서에서, 용어 "예측하는"은 환자가 약물(치료제) 또는 약물 세트 또는 치료 계획(therapeutic regimen)에 유리하게 또는 불리하게 반응하게 될 가능성을 지칭하는 데 사용된다. 일 실시 형태에서, 예측은 환자가 치료, 예를 들어 특정 치료제에 의한 치료 후에 생존하거나 개선될지의 여부 및/또는 그러할 확률에 관한 것이다.

본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "샘플"은, 예를 들어 물리적, 생화학적, 화학적 및/또는 생리학적 특성에 기초하여 특성화하고자 하고/하거나 확인하고자 하는 세포 및/또는 다른 분자 실체를 함유하는 관심 대상체로부터 획득되거나 유래되는 조성물을 지칭한다.

본 명세서에 사용되는 바와 같이, "대상체"는 임의의 동물, 바람직하게는 포유동물, 가장 바람직하게는 인간을 의미한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "포유동물"은 모든 포유동물을 포함한다. 포유동물의 예에는 소, 말, 양, 돼지, 고양이, 개, 마우스, 래트, 토끼, 기니 피그, 원숭이, 인간 등, 더 바람직하게는 인간이 포함되지만 이로 한정되지 않는다.

본 명세서에 사용되는 바와 같이, "자극된 세포", "자극된 샘플", "자극된 시험 혈액 샘플", 또는 "자극된 대조 혈액 샘플"은 본 출원의 방법에 의해 분석되거나 측정되기 전에 시험관내에서 하나 이상의 자극제에 노출되거나 그것으로 처리된 세포, 샘플, 시험 혈액 샘플 또는 대조 혈액 샘플을 각각 지칭한다. 자극제는 MALT1 및/또는 NF-kB 경로를 활성화시키는 임의의 작용제(agent)일 수 있다.

본 명세서에 사용되는 바와 같이, "시험 샘플" 또는 "시험 혈액 샘플"은 MALT1 억제제에 노출된 샘플 또는 혈액

샘플을 지칭한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "대조 샘플" 또는 "대조 혈액 샘플"은 MALT1 억제제에 노출되지 않았거나 MALT1 억제제에 의해 더 이상 영향을 받지 않는 것으로 알려진 샘플 또는 혈액 샘플을 지칭한다.

본 명세서에 사용되는 바와 같이, 암과 같은 질병 또는 장애와 관련하여 "치료하다", "치료하는" 또는 "치료"는 하기 중 하나 이상을 달성하는 것을 지칭한다: 장애의 중증도 및/또는 지속기간을 감소시킴; 치료되는 장애에 특징적인 증상의 악화를 억제함; 이전에 장애를 가졌던 대상체에서 그러한 장애의 재발을 제한하거나 예방함; 또는 장애에 대해 이전에 증상을 나타낸 대상체에서 증상의 재발을 제한하거나 예방함.

본 명세서에 사용되는 바와 같이, "비자극된 세포", "비자극된 샘플", "비자극된 시험 혈액 샘플", 또는 "비자극된 대조 혈액 샘플"은 본 출원의 방법에 의해 분석되거나 측정되기 전에 시험관내에서 하나 이상의 자극제에 노출되거나 그것으로 처리되거나 하지 않은 세포, 샘플, 시험 혈액 샘플 또는 대조 혈액 샘플을 각각 지칭한다. 자극제는 MALT1 및/또는 NF-kB 경로를 활성화시키는 임의의 작용제일 수 있다.

용어 "전혈"은 개체로부터 획득된 임의의 전혈 샘플을 지칭한다. 전형적으로, 전혈은 모든 혈액 성분, 예를 들어 세포 성분 및 혈장을 함유한다. 포유동물로부터 전혈을 획득하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다.

방법

MALT1 억제제가 투여되었던 대상체에서 MALT1 조절되는 유전자 발현을 모니터링하는 방법이 본 명세서에 개시된다. 본 발명은 또한 치료 또는 진단 방법에 사용하기 위한 MALT1 억제제를 제공한다. 본 명세서에서의 각각 하나하나의 모든 방법에 대하여, 본 발명은 그러한 치료적 또는 진단적 방법에 사용하기 위한 MALT1 억제제에 관한 추가의 실시 형태를 제공한다.

그러한 방법을 사용함으로써, MALT1 억제제에 대한 반응 또는 MALT1 억제제의 약력학적 효과(예를 들어, 약물 농도 또는 용량과 약리학적 또는 독성학적 반응의 관계)가 대상체에서 평가될 수 있다. 본 명세서에 개시된 방법은 신속하고, 고도로 재현가능하고, 비교적 저비용이다. 또한, 본 출원에 개시된 방법은 MALT1 억제제에 의한 치료에 적합한 대상체를 확인하고/하거나, MALT1 억제제 요법을 제공받는 대상체에 대한 치료 결정을 안내하고/하거나, 진행 중인 MALT1 억제제 요법의 효능을 모니터링하는 데 사용될 수 있다. 또한, 본 명세서에 개시된 방법은 종양 세포에서 MALT1에 의해 조절되는 유전자 발현을 모니터링하는 것으로 제한되지 않는다.

본 출원의 실시 형태에 따르면, MALT1 조절되는 유전자는 하류 Rel/NF-카파B 전사 인자에 의해 조절되는 임의의 유전자일 수 있으며, 이의 예에는 문헌[Pahl, Oncogene. 1999 Nov 22;18(49):6853-66], 문헌[Yang et al., Int J Clin Exp Med 2016;9(5):7986-7995], 문헌[Bardet et al., Immunol Cell Biol. 2018 Jan;96(1):81-99]에 기재된 것들, 및 월드 와이드 웹 사이트, 즉, "bioinfo.lifl.fr/NF-KB/" 및 "www.bu.edu/nf-kb/gene-resources/target-genes"를 통해 인터넷을 통해 제공된 것들이 포함되지만 이로 한정되지 않으며, 이들 모두의 내용은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다. 일부 실시 형태에서, MALT1 조절되는 유전자는 NF-kB와 독립적으로 조절되는 유전자일 수 있다. MALT1 조절되는 유전자 발현의 수준은 본 발명을 고려하여 임의의 적합한 방법을 사용하여, 예컨대 RNA 서열분석 검정, 유전자 발현 마이크로어레이, 또는 정량적 역전사 폴리머라제 연쇄 반응 검정(qRT-PCR)을 사용하여 측정될 수 있다.

소정 실시 형태에서, MALT1 조절되는 유전자는 표 1 내지 표 4에서의 것들로 이루어진 군, 바람직하게는 IL2, TNFRSF18, CD40LG, ICOS, CCL4, CTLA4, CCL20, CCL1, TNFRSF4, CCL3L1, IL6, CCL3, TNF, IL4, FEZ1, LTA, IL9, IFNG, IL3, IL1A, CCL8, CD163, CSF2, MRC1, IL22, IL13, POU2F2, CCR4, IL19, ADA, 및 PECAM1로 이루어진 군으로부터 선택된다.

일부 실시 형태에서, 대상체에서 MALT1 억제제에 대한 반응을 예측하는 방법은 (a) MALT1 억제제에 이전에 노출되었던 대상체의 시험 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계; (b) MALT1 억제제에 이전에 노출되지 않았던 대상체의 대조 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 대상체의 시험 샘플에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 상기 대조 샘플에서의 변화된 수준과 비교하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 시험 샘플에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준의 감소 또는 증가는 상기 대상체에서의 상기 MALT1 억제제에 대한 양성 반응으로 예측된다.

다른 실시 형태에서, 대상체에서 진행 중인 MALT1 억제제 요법의 효능을 모니터링하는 방법은 (a) MALT1 억제제에 이전에 노출되었던 대상체의 시험 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계; (b) MALT1 억제제에 이전에 노출되지 않았던 대상체의 대조 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 대상체의 시험 샘플에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 상기

대조 샘플에서의 변화된 수준과 비교하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 시험 샘플에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준의 감소 또는 증가는 상기 대상체에서의 MALT1 억제제 요법의 효능을 나타낸다.

본 명세서에 개시된 임의의 방법에서, 대상체의 시험 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계는,

a) 상기 대상체의 시험 샘플을 획득하는 단계;

b) 상기 시험 샘플의 제1 부분을 하나 이상의 자극제와 접촉시켜 자극된 시험 샘플을 획득하는 단계;

c) 비자극된 시험 샘플로서 상기 하나 이상의 자극제와 접촉되지 않은 상기 시험 샘플의 제2 부분을 유지하는 단계;

d) 상기 자극된 시험 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 제1 수준을 측정하는 단계; 및

e) 상기 비자극된 시험 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 제2 수준을 측정하는 단계로서, 상기 자극된 샘플로부터의 세포와 상기 비자극된 샘플로부터의 세포는 동일한 세포 유형을 갖는, 상기 단계; 및

e) MALT1 조절되는 유전자 발현의 제1 수준을 MALT1 조절되는 유전자 발현의 제2 수준과 비교함으로써 상기 시험 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계를 포함한다.

본 명세서에 개시된 임의의 방법에서, 대조 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계는 전술된 것과 유사한 단계들을 수반하고,

a) 상기 대상체의 대조 샘플을 획득하는 단계;

b) 상기 대조 샘플의 제1 부분을 상기 하나 이상의 자극제와 접촉시켜 자극된 대조 샘플을 획득하는 단계;

c) 비자극된 대조 샘플로서 상기 하나 이상의 자극제와 접촉되지 않은 상기 대조 샘플의 제2 부분을 유지하는 단계;

c) 상기 자극된 대조 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 제3 수준을 측정하는 단계;

d) 상기 비자극된 대조 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 제4 수준을 측정하는 단계로서, 상기 자극된 샘플로부터의 세포와 상기 비자극된 샘플로부터의 세포는 동일한 세포 유형을 갖는, 상기 단계; 및

e) MALT1 조절되는 유전자 발현의 제3 수준을 MALT1 조절되는 유전자 발현의 제4 수준과 비교함으로써 상기 대조 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계를 포함한다.

일부 실시 형태에서, 대조 샘플에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준이 저장되고, 그 정보는 검색되고 본 출원의 방법에서 대조군으로서 사용될 수 있다. 소정 실시 형태에서, 대조 혈액 샘플에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 결정된 변화된 수준은 대상체의 의료 기록의 일부로서 저장될 수 있다.

일단 시험 샘플 및 대조 샘플에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준이 획득되면, 2개 사이의 변화된 수준을 비교할 수 있다. 대상체의 시험 샘플에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 대조 샘플에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준과 비교함으로써, 당업자는 하기와 같은 것을 할 수 있다:

- 대상체에서 MALT1 억제제에 대한 반응을 예측할 수 있다.
- 대상체에서 진행 중인 MALT1 억제제 요법의 효능을 모니터링할 수 있다.
- 대상체에서 암 또는 MALT1-매개 질병을 치료할 수 있다.
- 대상체에서 암 또는 MALT1-매개 질병을 치료하기 위한 약물 계획을 설계할 수 있다.
- 대상체에서 MALT1 억제제의 용량 및/또는 투여 빈도를 변형시킬 수 있다.

일부 실시 형태에서, 대조 샘플과 대비하여 시험 샘플에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준의 감소 또는 증가는 대상체에서의 MALT1 억제제에 대한 양성 반응으로 예측된다.

일부 실시 형태에서, 대조 샘플과 대비하여 시험 샘플에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준의 감소 또는 증가는 대상체에서의 MALT1 억제제 요법의 효능을 나타낸다.

일부 실시 형태에서, 시험 샘플이 대조 샘플과 대비하여 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준의 감소 또는 증가를 나타낸다면 대상체에게 더 낮은 용량의 MALT1 억제제가 투여될 수 있다.

일부 실시 형태에서, 시험 샘플이 대조 샘플과 대비하여 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준의 감소 또는 증가를 나타내지 않는다면 대상체에게 더 높은 용량의 MALT1 억제제가 투여될 수 있다.

일부 실시 형태에서, 시험 샘플이 대조 샘플과 대비하여 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준의 감소 또는 증가를 나타내지 않는다면 대상체에게 제2 치료제가 투여될 수 있다.

일부 실시 형태에서, 시험 샘플이 대조 샘플과 대비하여 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준의 감소 또는 증가를 나타낸다면 대상체에서의 MALT1 억제제의 투여 빈도가 감소될 수 있다.

일부 실시 형태에서, 시험 샘플이 대조 샘플과 대비하여 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준의 감소 또는 증가를 나타내지 않는다면 MALT1 억제제의 투여 빈도가 증가될 수 있다.

일부 실시 형태에서, 시험 샘플은 MALT1 억제제에 노출되었던 대상체의 샘플이고, 대조 샘플은 MALT1 억제제에 노출되지 않았던 대상체의 샘플이다. 바람직하게는, 시험 샘플과 대조 샘플은 동일한 대상체로부터의 것이다.

일부 실시 형태에서, 시험 샘플은 시험관내에서 MALT1 억제제에 노출되는 대상체의 샘플일 수 있다. 예를 들어, 인간 대상체에 MALT1 억제제가 투여되기 전에 샘플이 인간 대상체로부터 획득된다. 그러한 샘플이 시험관내에서 MALT1 억제제와 접촉되어 시험 샘플을 획득할 수 있다. 소정 실시 형태에서, 대상체의 샘플은 약 1 내지 약 16시간, 약 1 내지 약 12시간, 약 1 내지 약 10시간, 또는 약 1 내지 약 8시간 동안 MALT1 억제제와 접촉되거나 그와 함께 인큐베이션된다. 비제한적인 예에는, 시험 샘플을 획득하기 위하여, 바람직하게는 37℃에서, 약 2, 4, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 또는 16시간이 포함된다. MALT1 억제제는 약 1 내지 약 500 마이크로몰(micromolar), 약 1 내지 약 400 마이크로몰, 약 1 내지 약 300 마이크로몰, 약 1 내지 약 200 마이크로몰, 또는 약 1 내지 약 100 마이크로몰의 농도로 샘플과 접촉될 수 있다. 획득된 시험 샘플은 하나 이상의 자극제에 노출될 수 있고, MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준이 본 명세서에 기재된 바와 같이 측정될 수 있다. 시험 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정함으로써, 대상체에서 MALT1 억제제에 대한 반응을 예측할 수 있다.

일부 실시 형태에서, 시험 샘플은 생체내에서 MALT1 억제제에 노출되는 대상체의 샘플일 수 있다. 예를 들어, 인간 대상체에 MALT1 억제제가 투여된 후에 샘플이 인간 대상체로부터 획득된다. 바람직하게는, 샘플은 대상체에 약 0.1 mg 내지 약 3000 mg, 약 1 mg 내지 약 1000 mg, 또는 약 10 mg 내지 약 500 mg의 용량으로 MALT1 억제제가 투여된 후에 대상체로부터 획득된다. 대상체로부터의 샘플은 MALT1 억제제의 투여 후 적어도 3시간, 적어도 6시간, 적어도 8시간, 적어도 10시간, 적어도 12시간, 적어도 24시간 또는 그 이상 후에 획득될 수 있다. 획득된 시험 샘플은 하나 이상의 자극제에 노출될 수 있고, MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준이 본 명세서에 기재된 바와 같이 측정될 수 있다. 시험 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정함으로써, 대상체에서 MALT1 억제제에 대한 반응을 예측할 수 있다.

일부 실시 형태에서, 대상체의 샘플은 임의의 세포 또는 조직일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 대상체의 샘플은 정상 세포, 정상 조직, 종양 세포, 종양 조직, 또는 임의의 악성 세포일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 대상체의 샘플은 전혈이다. 일부 실시 형태에서, 대상체의 샘플은 전혈로부터 단리된 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 시험 샘플은 MALT1 억제제가 투여되었던 대상체로부터 획득된 전혈 또는 PBMC이다. 일부 실시 형태에서, 대조 샘플은 MALT1 억제제가 투여되기 전에 대상체로부터 획득된 전혈 또는 PBMC이다. 일부 실시 형태에서, 시험 샘플과 대조 샘플은 동일한 대상체로부터의 것이다. 일부 실시 형태에서, 시험 샘플과 대조 샘플은 동일한 세포 유형을 갖는다.

본 명세서에 개시된 임의의 방법에서, 대상체의 샘플(시험 샘플 또는 대조 샘플)을 획득한 후에, 샘플은 부분들로 분할되고, 하나 이상의 자극제로 처리되어 자극된 시험 샘플 또는 자극된 대조 샘플을 획득할 수 있다. 비처리된 것은 비자극된 시험 샘플 또는 비자극된 대조 샘플로서의 역할을 할 것이다.

MALT1 및/또는 NF-kB 경로를 활성화시킬 수 있는 임의의 자극제가 대상체의 시험 샘플 또는 대조 샘플을 자극하는 데 사용될 수 있다. 일 실시 형태에서, 자극제는 전염증성 사이토카인, 예컨대 IL-1α, IL-1β, TNF-α; 세균 독소, 예컨대 지질다당류(LPS), 외독소 B, 포르볼 미리스테이트 아세테이트(PMA)/이오노마이신; TLR 효능제(agonist), 예컨대 CpG; 항-CD3 항체, 항-CD8 항체 및 항-IgM 항체, 또는 상기 항체의 항원-결합 단편, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직하게는, 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체 또는 이들의 항원-

결합 단편 중 적어도 하나, 더 바람직하게는, 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체 또는 이들의 항원-결합 단편 둘 모두가 대상체의 샘플을 활성화시키는 데 사용된다. 다른 실시 형태에서, 항-IgM 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 대상체의 샘플을 활성화시키기 위한 자극제로서 사용된다.

소정 실시 형태에서, 시험 샘플 또는 대조 샘플은 약 1 내지 12시간, 약 1 내지 10시간, 약 1 내지 9시간, 또는 약 1 내지 8시간 동안 자극제들 중 하나 이상과 접촉된다. 비제한적인 예에는, 자극된 시험 샘플 또는 자극된 대조 샘플을 획득하기 위하여, 바람직하게는 37℃에서, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 또는 9시간이 포함된다.

일단 자극된 대상체의 샘플 및 비자극된 대상체의 샘플이 획득되면, 대상체의 샘플에서의 MALT1 의존성 유전자 발현은 임의의 유전자 발현 분석 방법, 예컨대 RNA 서열분석 검정, 유전자 발현 마이크로어레이, 또는 정량적 역전사 폴리머라제 연쇄 반응 검정(qRT-PCR) 등을 이용하여 측정될 수 있다.

소정 실시 형태에서, 대상체의 세포에서의 MALT1 의존성 유전자 발현은 하기 단계들을 포함하는 방법을 사용하여 결정된다: a) 대상체의 세포를 단리하는 단계; b) 상기 대상체의 세포로부터 RNA를 추출하는 단계; c) 상기 추출된 RNA를 유전자 발현 분석 방법을 거쳐서, 상기 NF-κB 의존성 유전자 발현이 억제되는지를 결정하는 단계.

대조군과 대비하여 MALT1 조절되는 유전자 발현의 수준의 증가 또는 감소는 MALT1 억제제가 대상체를 치료하는 데 효과적임을 나타낸다. MALT1 억제제에 의한 처리 시에 발현 수준의 증가를 나타내는 MALT1 조절되는 유전자의 예에는 PLAU, IL6, CXCL5, C3, CXCL3, IL8, CD22, PTGS2, IL10, IL12B, DUSP4, VEGFA, IFNB1, KIR 억제 하위군 1, PLAUR, TREM1, IL1R2, SERPINB2, CXCL2, IRAK2, C3AR1, KIR3DL1, SLC11A1, CCRL2, AMICA1, CCL23, IL1RAP, CCR4, TNFSF18, ATM, MAGEA4, THBS1, LGALS3, CCL3L1, CEBPB, IL1RL2, THBD, IL24, ADORA2A, CXCR4, LY9, PPBP, CCL16, IL15RA, IFNA8, FCER1G, IFNGR1, S100A8, CD209, TNFRSF14, OSM, EBI3, IL3RA, ADA, IRAK2, BAGE, IL19, TNFRSF8, CCL3, CCL19, IFNGR1, LIF, IFIT1, CCL24, ITGB3, IL23A, CD83, BCL6, CSF1, FCERG1, THBD, VEGFC, TFRC, SLAMF7, IL2RA, BCL2L1, SELE, S100B, RORA, TNFRSF1B, TNFSF15, CCRL2, ATM, RUNX3, IFI27, PRG2, CEBPB, ITGA1, CDH1, CCL22, LYN, NOS2A, IFNB1, KLRB1, IL1R1, FOS, SELPLG, CSF3, 및 CCL13이 포함될 수 있지만 이로 한정되지 않는다. 소정 실시 형태에서, MALT1 조절되는 유전자 발현 수준의 증가는 본 명세서에 개시된 유전자들 중 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 또는 적어도 10개에서 관찰된다.

MALT1 억제제에 의한 처리 시에 발현 수준의 감소를 나타내는 MALT1 조절되는 유전자의 예에는 CXCL10, FN1, CXCL9, CXCL11, IL2, CCL8, CMKLR1, MSR1, EGR2, CCL13, IL21, EGR1, IL1RN, TNFSF10, IL17B, MRC1, TNFRSF4, TNFSF13B, APOE, TNFRSF13B, IFNG, C1QA, CD36, CD244, CXCL6, CD163, CCL28, ULBP2, HAMP, TNF, IFIT2, PPARG, OAS3, CCL27, BIRC5, C9, AXL, MASP1, MUC1, CD274, TLR8, CT45A1, NLRP3, CFD, NOS2A, CCR3, CD70, BST2, RELA, TPTE, IFI35, IL7, MAGEA1, XCL2, SPP1, FCGR1A, SERPING1, TNFRSF11A, DUSP6, NLRP3, TICAM2,IRF8, TNFRSF9, PDCDILG2, HLA-DMB, CD86, FCGR2B, IRF1, CMKLR1, CASP10, CFD, CAMP, FCER1A, IFNL2, TNFSF8, MBL2, CD160, TNFRSF4, MEF2C, CCL7, CCR2, TAP1, HLA-DMA, MS4A1, STAT1, A2M, CCL2, MAGEA3, C2, TLR8, FCGR3A, PASD1, ALCAM, CXCL1, NUBP1, CX3CR1, SPANXB1, CD1D, 및 LTB가 포함될 수 있지만 이로 한정되지 않는다. 소정 실시 형태에서, MALT1 조절되는 유전자 발현 수준의 감소는 본 명세서에 개시된 유전자들 중 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 또는 적어도 10개에서 관찰된다.

일부 실시 형태에서, 시험 샘플에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 대조 샘플에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준과 비교하는 단계는 대상체에서의 MALT1 억제제 효능에 대한 정보를 제공할 수 있다. 예를 들어, 대조 샘플과 대비하여 시험 샘플에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준의 감소 또는 증가는 MALT1 억제제가 대상체에서 효과적임을 나타낼 수 있다. 소정 실시 형태에서, 대조 샘플과 대비하여 시험 샘플에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준의 감소는 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9% 또는 그 이상, 또는 이들 사이의 임의의 범위(들)만큼 이루어진다. 소정 실시 형태에서, 대조 샘플과 대비하여 시험 샘플에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준의 증가는 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9% 또는 그 이상, 또는 이들 사이의 임의의 범위(들)만큼 이루어진다.

소정 실시 형태에서, 상기 방법은 RNA의 추출 전에 혈액 샘플로부터 PBMC를 풍부화하거나 단리하는 단계를 포함한다. PBMC는 본 명세서를 고려하여 당업계에 알려진 방법을 사용하여 전혈 샘플로부터 풍부화되거나 단리될

수 있다. 예를 들어, 혈액 샘플 중의 PBMC는 밀도 구배 원심분리에 의해 적혈구 및 과립구(호중구, 호염기구 및 호산구)로부터 분리될 수 있으며, 여기서 PBMC는 저밀도 분획(상부 분획) 중에 잔존하고, 적혈구 및 과립구는 더 높은 밀도의 분획(하부 분획) 중에 잔존한다. PBMC는 또한, RNA의 추출 전에 혈액 샘플 중의 적혈구를 용해시킴으로써 풍부화될 수 있다.

PBMC는 불균질한 세포 집단이고, 전형적으로 70 내지 90% 범위의 림프구, 10 내지 20%의 단핵구, 1 내지 2%의 수지상 세포를 포함한다. 림프구 집단 내의 세포 유형의 빈도는, 예를 들어 70 내지 85%의 $CD3^+$ T 세포, 5 내지 10%의 B 세포, 및 5 내지 20%의 NK 세포를 포함한다. 하나 이상의 자극제에 반응하는 말초 혈액에 존재하는 임의의 PBMC는 현재 기재된 방법으로 자극되고 분석될 수 있다. 소정 실시 형태에서, PBMC는 T 세포, B 세포, 자연 살해 세포, 단핵구, 및 수지상 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 세포이다. 바람직한 실시 형태에서, PBMC는 T 세포이며, 이는, 예를 들어 $CD3^+$, $CD4^+$ 및/또는 $CD8^+$인 T 세포일 수 있다. 다른 실시 형태에서, PBMC는 B 세포이며, 이는, 예를 들어 $CD19^+$ B 세포일 수 있다.

소정 실시 형태에서, 혈액 샘플의 PBMC에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 수준은 PBMC의 어떠한 풍부화 또는 단리 없이 측정된다. 다른 실시 형태에서, 혈액 샘플의 PBMC에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 수준은 PBMC가 혈액 샘플로부터 풍부화되거나 단리된 후에 PBMC로부터 측정된다.

예시적인 실시 형태에서, DLBCL 또는 CLL 환자로부터의 전혈 샘플이 항-CD3/항-CD28 항체로 자극된다. 자극 후에, PBMC는 혈액 샘플로부터 단리된다. 자극되지 않은 혈액 샘플로부터 PBMC를 단리하는 데에도 유사한 방법이 사용된다. 자극된 PBMC 및 비자극된 PBMC 둘 모두로부터 RNA가 추출되고, MALT1 조절되는 유전자의 발현이 분석된다. MALT1 억제제가 효과적인 경우, DLBCL 환자에서의 자극된 PBMC에서뿐만 아니라, CLL 환자로부터의 PBMC 세포에서도 IL-2 및 CXCL10의 발현이 크게 억제되는 것으로 확인된다.

대상체를 치료하는 방법이 또한 본 명세서에 개시된다. 일부 실시 형태에서, 암 또는 MALT1-매개 질병의 치료를 필요로 하는 대상체에서 상기 암 또는 MALT1-매개 질병을 치료하는 방법은 (a) MALT1 억제제에 이전에 노출되었던 대상체의 시험 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계; (b) MALT1 억제제에 이전에 노출되지 않았던 대상체의 대조 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계; (c) 상기 대상체의 시험 샘플에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 상기 대조 샘플에서의 변화된 수준과 비교하는 단계; 및 (d) 상기 시험 샘플이 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준의 감소 또는 증가를 나타낸다면 상기 대상체에게 더 낮은 용량의 MALT1 억제제를 투여하고, 상기 시험 샘플이 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준의 감소 또는 증가를 나타내지 않는다면 상기 대상체에게 더 높은 용량의 MALT1 억제제를 투여하는 단계를 포함한다.

다른 실시 형태에서, 대상체에서 암 또는 MALT1-매개 질병을 치료하는 방법은 (a) MALT1 억제제에 이전에 노출되었던 대상체의 시험 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계; (b) MALT1 억제제에 이전에 노출되지 않았던 대상체의 대조 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계; (c) 상기 대상체의 시험 샘플에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 상기 대조 샘플에서의 변화된 수준과 비교하는 단계; 및 (d) 상기 시험 샘플이 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준의 감소 또는 증가를 나타낸다면 상기 대상체에게 MALT1 억제제의 유효량을 투여하는 단계를 포함한다.

일부 실시 형태에서, 암 또는 MALT1-매개 질병의 치료를 필요로 하는 대상체에서 상기 암 또는 MALT1-매개 질병을 치료하는 방법은 (a) MALT1 억제제에 이전에 노출되었던 대상체의 시험 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계; (b) MALT1 억제제에 이전에 노출되지 않았던 대상체의 대조 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계; (c) 상기 대상체의 시험 샘플에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 상기 대조 샘플의 변화된 수준과 비교하는 단계; 및 (d) 상기 시험 샘플이 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준의 감소 또는 증가를 나타낸다면, 상기 치료 방법을 계속하고, 상기 시험 샘플이 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준의 감소 또는 증가를 나타내지 않는다면, 상기 치료 방법을 정지하는 단계를 포함한다.

일부 실시 형태에서, 대상체에서 암 또는 MALT1-매개 질병을 치료하기 위한 약물 계획을 설계하는 방법은 (a) MALT1 억제제에 이전에 노출되었던 대상체의 시험 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계; (b) MALT1 억제제에 이전에 노출되지 않았던 대상체의 대조 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계; (c) 상기 대상체의 시험 샘플에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 상기 대조 샘플에서의 변화된 수준과 비교하는 단계; 및 (d) 상기 시험 샘플이 MALT1 조절되는 유전자 발현

의 변화된 수준의 감소 또는 증가를 나타내지 않는다면 상기 대상체에게 제2 치료제를 투여하는 단계를 포함한다.

일부 실시 형태에서, 암 또는 MALT1-매개 질병을 앓고 있는 대상체에서 MALT1 억제제의 용량 및/또는 투여 빈도를 변형시키는 방법은 (a) MALT1 억제제에 이전에 노출되었던 대상체의 시험 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계; (b) MALT1 억제제에 이전에 노출되지 않았던 대상체의 대조 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계; (c) 상기 대상체의 시험 샘플에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 상기 대조 샘플의 변화된 수준과 비교하는 단계; 및 (d) 상기 시험 샘플이 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준의 감소 또는 증가를 나타낸다면, 상기 MALT1 억제제의 투여 빈도를 감소시키고, 상기 시험 샘플이 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준의 감소 또는 증가를 나타내지 않는다면, MALT1 억제제의 투여 빈도를 증가시키는 단계를 포함한다.

일부 실시 형태에서, MALT1-매개 질병은 암이다. 소정 실시 형태에서, 암은 림프종, 백혈병, 암종, 및 육종으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 암은, 예를 들어 비호지킨 림프종, 미만성 거대 B-세포 림프종(DLBCL), 외투 세포 림프종(MCL), 여포성 림프종(FL), 점막-관련 림프 조직(MALT) 림프종, 변연부 림프종, T-세포 림프종, 호지킨 림프종, 버킷 림프종, 다발성 골수종, 만성 림프구성 백혈병(CLL), 림프아구성 T 세포 백혈병, 만성 골수원성 백혈병(CML), 소림프구성 림프종(SLL), 발덴스트룀 거대글로불린혈증, 림프아구성 T 세포 백혈병, 만성 골수원성 백혈병(CML), 모발상-세포 백혈병, 급성 림프아구성 T 세포 백혈병, 형질세포종, 면역아구성 대세포 백혈병, 거핵아구성 백혈병, 급성 거핵구성 백혈병, 전골수구성 백혈병, 적백혈병, 뇌(신경교종), 교아세포종, 유방암, 결직장암/결장암, 전립선암, 비소세포 폐암을 포함한 폐암, 위암, 자궁내막암, 흑색종, 췌장암, 간암, 신장암, 편평 세포 암종, 난소암, 육종, 골육종, 갑상선암, 방광암, 두경부암, 고환암, 유잉 육종, 횡문근육종, 수아세포종, 신경아세포종, 자궁경부암, 신세포암(renal cancer), 요로상피암, 외음부암, 식도암, 타액선암, 비인두암, 볼암(buccal cancer), 구강암(cancer of the mouth), 및 GIST(위장관 간질 종양)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

일 실시 형태에서, 인간 대상체는 림프종, 예컨대 호지킨 림프종 또는 비호지킨 림프종(NHL), 바람직하게는 미만성 거대 B-세포 림프종(DLBCL), 더 바람직하게는 DLBCL의 활성화된 B-세포-유사(ABC) 아형에 대한 치료를 필요로 한다. 다른 실시 형태에서, 인간 대상체는 백혈병, 예컨대 급성 림프구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병(CLL), 급성 골수성 백혈병, 또는 만성 골수성 백혈병, 바람직하게는 CLL에 대한 치료를 필요로 한다.

또 다른 실시 형태에서, MALT1-매개 질병은 자가면역 및 염증성 장애를 포함하지만 이로 한정되지 않는 면역학적 질병이며, 이러한 면역학적 질병은, 예를 들어 관절염, 염증성 장 질병, 위염, 강직성 척추염, 궤양성 결장염, 췌장염, 크론병, 셀리악병, 다발성 경화증, 전신 홍반성 루푸스, 루푸스 신염, 류머티스성 열, 통풍, 기관 이식 거부반응, 만성 동종이식편 거부반응, 급성 또는 만성 이식편-대-숙주 질병, 아토피성 피부염을 포함한 피부염, 피부근염, 건선, 베체트병, 포도막염, 중증 근무력증, 그레이브스병, 하시모토 갑상선염, 쇼그렌 증후군, 수포성 장애, 항체-매개 혈관염 증후군, 면역-복합체 혈관염, 알레르기성 장애, 천식, 기관지염, 만성 폐색성 폐 질병(COPD), 낭포성 섬유증, 폐렴, 부종, 색전증, 섬유증, 사르코이드증, 고혈압 및 기종을 포함한 폐 질병, 규폐증, 호흡 부전, 급성 호흡곤란 증후군, BENTA 질병, 베릴륨 중독, 및 다발성 근염이다.

일부 실시 형태에서, 대상체에서 암 또는 MALT1-매개 질병을 치료하는 방법은, 시험 샘플이 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준의 감소 또는 증가를 나타낸다면, 대상체에게 더 낮은 용량의 MALT1 억제제를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 대상체에게는 약 1 mg, 약 10 mg, 약 50 mg, 약 100 mg, 약 150 mg, 약 200 mg, 또는 약 250 mg으로부터 선택되는 더 낮은 용량의 MALT1 억제제가 투여될 수 있다.

일부 실시 형태에서, 대상체에서 암 또는 MALT1-매개 질병을 치료하는 방법은, 시험 샘플이 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준의 감소 또는 증가를 나타내지 않는다면, 대상체에게 더 높은 용량의 MALT1 억제제를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 대상체에게는 약 500 mg, 약 1000 mg, 또는 약 3000 mg으로부터 선택되는 더 높은 용량의 MALT1 억제제가 투여될 수 있다.

일부 실시 형태에서, 대상체에서 암 또는 MALT1-매개 질병을 치료하는 방법은, 시험 샘플이 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준의 감소 또는 증가를 나타낸다면, 대상체에게 MALT1 억제제의 유효량을 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시 형태에서, MALT1 억제제의 유효량은 약 0.1 mg 내지 약 3000 mg, 약 1 mg 내지 약 1000 mg, 또는 약 10 mg 내지 약 500 mg이다.

일부 실시 형태에서, 대상체에서 암 또는 MALT1-매개 질병을 치료하기 위한 약물 계획을 설계하는 방법은, 시험

샘플이 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준의 감소 또는 증가를 나타내지 않는다면, 대상체에게 제2 치료제를 투여하는 단계를 포함한다. 예를 들어, 투여될 수 있는 제2 치료제는 BTK(브루톤 티로신 키나제) 억제제, 예컨대 이브루티닙, SYK 억제제, PKC 억제제, PI3K 경로 억제제, BCL 패밀리 억제제, JAK 억제제, PIM 키나제 억제제, 리툭시맙 또는 다른 B 세포 항원-결합 항체뿐만 아니라, 면역 세포 재유도제(immune cell redirection agent)(예를 들어, 블리나투모맙 또는 CAR T-세포) 및 면역조절제, 예컨대 다라투무맙, 항-PD1 항체, 및 항-PD-L1 항체로부터 선택된다.

일부 실시 형태에서, 암 또는 MALT1-매개 질병을 앓고 있는 대상체에서 MALT1 억제제의 용량 및/또는 투여 빈도를 변형시키는 방법은, 시험 샘플이 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준의 감소 또는 증가를 나타낸다면 MALT1 억제제의 투여 빈도를 감소시키는 단계를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 대상체에게는 MALT1 억제제가 더 낮은 투여 빈도로, 예컨대 매일 1회 투여될 수 있다. 투여될 수 있는 MALT1 억제제의 유효량은 약 1 mg 내지 약 1000 mg일 수 있다.

일부 실시 형태에서, 암 또는 MALT1-매개 질병을 앓고 있는 대상체에서 MALT1 억제제의 용량 및/또는 투여 빈도를 변형시키는 방법은, 시험 샘플이 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준의 감소 또는 증가를 나타내지 않는다면 MALT1 억제제의 투여 빈도를 증가시키는 단계를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 대상체에게는 MALT1 억제제가 더 높은 투여 빈도로, 예컨대 매일 2회 또는 매일 3회 또는 하루당 4회 투여될 수 있다. 투여될 수 있는 MALT1 억제제의 유효량은 약 1 mg 내지 약 1000 mg일 수 있다.

일부 실시 형태에서, 본 명세서에 개시된 MALT1 억제제의 조성물은 피하, 국소, 경구 및 근육내와 같은 다양한 경로에 의해 대상체에게 투여될 수 있다. 조성물의 투여는 경구로 또는 비경구로 달성될 수 있다. 비경구 전달의 방법은 국소, 동맥내(조직에 직접 전달), 근육내, 피하, 수내, 수강내, 뇌실내, 정맥내, 복막내, 또는 비강내 투여를 포함한다.

소정 실시 형태에서, 상기 방법은 대상체가 CD79B 유전자에서 돌연변이를 갖는지의 여부를 결정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 소정 실시 형태에서, 상기 방법은 대상체가 CARD11 유전자에서 돌연변이를 갖는지의 여부를 결정하는 단계를 추가로 포함한다. 대상체가 CD79B 또는 CARD11 유전자에서 돌연변이를 갖는지의 여부를 결정하는 방법은 당업계에 알려져 있다. 비제한적인 예로서, 유전자(예를 들어, CD79B 또는 CARD11)는 서열분석되고 유전자의 야생형 버전과 비교될 수 있다.

본 출원의 실시 형태는 또한 MALT1-매개 질병의 치료를 필요로 하는 대상체에서 상기 MALT1-매개 질병을 치료하는 데 사용하기 위한 MALT1 억제제를 포함하며, 여기서 상기 MALT1 억제제는 본 출원의 실시 형태에 따른 방법을 사용하여 상기 대상체에서 상기 MALT1-매개 질병에 대해 효능이 있는 것으로 확정되어 있다.

본 발명은 다른 실시 형태들 중 어느 하나에 기재된 바와 같은 방법에 사용하기 위한 MALT1 억제제에 관한 것이다.

본 발명은 다른 실시 형태들 중 어느 하나에 기재된 바와 같은 MALT1-매개 질병을 치료하는 방법에 사용하기 위한 MALT1 억제제에 관한 것이다.

본 발명은 다른 실시 형태들 중 어느 하나에 기재된 바와 같은 MALT1-매개 질병을 치료하는 데 사용하기 위한 MALT1 억제제에 관한 것이다.

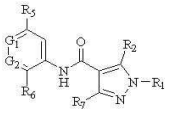
본 발명은 다른 실시 형태들 중 어느 하나에 기재된 바와 같은 MALT1-매개 질병을 치료하는 데 사용하기 위한 MALT1 억제제에 관한 것이다.

본 명세서에 제공된 생체내 진단 방법에 사용하기 위한 MALT1 억제제는 인간 또는 동물의 신체에 대해 실시되는 진단 방법에 사용하기 위한 MALT1 억제제를 포함할 수 있음이 이해될 것이다.

조성물

MALT1 억제제의 조성물이 또한 본 명세서에 개시된다. 일부 실시 형태에서, MALT1 억제제는 화학식 (I)의 화합물, 또는 이의 거울상이성질체, 부분입체 이성질체, 용매화물, 또는 약제학적으로 허용되는 염 형태이다:

[화학식 (I)]



(상기 식에서,

R_1은

i) 플루오로 또는 아미노 치환체로 선택적으로 치환된 나프탈렌-1-일;

및

ii) O, N, 및 S로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 함유하되, 1개의 헤테로원자만이 O 또는 S가 되는 9원 또는 10원 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되며; 여기서, ii)의 상기 헤테로아릴은 독립적으로 중수소, 메틸, 에틸, 프로필, 아이소프로필, 트라이플루오로메틸, 사이클로프로필, 메톡시메틸, 다이플루오로메틸, 1,1-다이플루오로에틸, 하이드록시메틸, 1-하이드록시에틸, 1-에톡시에틸, 하이드록시, 메톡시, 에톡시, 플루오로, 클로로, 브로모, 메틸티오, 시아노, 아미노, 메틸아미노, 다이메틸아미노, 4-옥소테트라하이드로푸란-2-일, 5-옥소피롤리딘-2-일, 1,4-다이옥사닐, 아미노카르보닐, 메틸카르보닐, 메틸아미노카르보닐, 옥소, 1-(t-부톡시카르보닐)아제티딘-2-일, N-(메틸)포름아미도메틸, 테트라하이드로푸란-2-일, 3-하이드록시-피롤리딘-1-일, 피롤리딘-2-일, 3-하이드록시아제티디닐, 아제티딘-3-일, 또는 아제티딘-2-일로부터 선택되는 1개 또는 2개의 치환체로 선택적으로 치환되고;

R_2는 C_{1-4}알킬, 1-메톡시-에틸, 다이플루오로메틸, 플루오로, 클로로, 브로모, 시아노, 및 트라이플루오로메틸로 이루어진 군으로부터 선택되고;

G_1은 N 또는 C(R_4)이고;

G_2는 N 또는 C(R_3)이되, 어느 경우에도 G_1 및 G_2 중 하나만이 N이 되고;

R_3은 독립적으로 트라이플루오로메틸, 시아노, C_{1-4}알킬, 플루오로, 클로로, 브로모, 메틸카르보닐, 메틸티오, 메틸설피닐, 및 메탄설포닐로 이루어진 군으로부터 선택되거나; 또는, G_1이 N일 때, R_3은 추가로 C_{1-4}알콕시카르보닐로부터 선택되고;

R_4는

i) G_2가 N일 때, 수소;

ii) C_{1-4}알콕시;

iii) 시아노;

iv) 사이클로프로필옥시;

v) 트라이아졸릴, 옥사졸릴, 아이소옥사졸릴, 피라졸릴, 피롤릴, 티아졸릴, 테트라졸릴, 옥사다이아졸릴, 이미다졸릴, 2-아미노-피리미딘-4-일, 2H-[1,2,3]트라이아졸로[4,5-c]피리딘-2-일, 2H-[1,2,3]트라이아졸로[4,5-b]피리딘-2-일, 3H-[1,2,3]트라이아졸로[4,5-b]피리딘-3-일, 1H-[1,2,3]트라이아졸로[4,5-c]피리딘-1-일로 이루어진 군으로부터 선택되는 헤테로아릴 - 여기서, 상기 헤테로아릴은 옥소, C_{1-4}알킬, 카르복시, 메톡시카르보닐, 아미노카르보닐, 하이드록시메틸, 아미노메틸, (다이메틸아미노)메틸, 아미노, 메톡시메틸, 트라이플루오로메틸, 아미노(C_{2-4}알킬)아미노, 또는 시아노로부터 독립적으로 선택되는 1개 또는 2개의 치환체로 선택적으로 치환됨 -;

vi) 1-메틸-피페리딘-4-일옥시;

vii) 4-메틸-피페라진-1-일카르보닐;

viii) (4-아미노부틸)아미노카르보닐;

ix) (4-아미노)부톡시;

x) 4-(4-아미노부틸)-피페라진-1-일카르보닐;

xi) 메톡시카르보닐;

xii) 5-클로로-6-(메톡시카르보닐)피리딘-3-일아미노카르보닐;

xiii) 1,1-다이옥소-아이소티아졸리딘-2-일;

xiv) 3-메틸-2-옥소-2,3-다이하이드로-1H-이미다졸-1-일;

xv) 2-옥소피롤리딘-1-일;

xvi) (*E*)- (4-아미노부트-1-엔-1-일-아미노카르보닐;

xvii) 다이플루오로메톡시; 및

xviii) 모르폴린-4-일카르보닐로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R_5는 독립적으로 수소, 클로로, 플루오로, 브로모, 메톡시, 메틸설포닐, 시아노, C_{1-4}알킬, 에티닐, 모르폴린-4-일, 트라이플루오로메틸, 하이드록시에틸, 메틸카르보닐, 메틸설피닐, 3-하이드록시-피롤리딘-1-일, 피롤리딘-2-일, 3-하이드록시아제티디닐, 아제티딘-3-일, 아제티딘-2-일, 메틸티오, 및 1,1-다이플루오로에틸로 이루어진 군으로부터 선택되거나;

또는 R_4와 R_5는 함께 결합되어 8-클로로-4-메틸-3-옥소-3,4-다이하이드로-*2H*-벤조[*b*][1,4]옥사진-6-일, 8-클로로-3-옥소-3,4-다이하이드로-*2H*-벤조[*b*][1,4]옥사진-6-일, 2-메틸-1-옥소-1,2,3,4-테트라하이드로아이소퀴놀린-7-일, 4-메틸-3-옥소-3,4-다이하이드로-2H-벤조[b][1,4]옥사진-6-일, 3-옥소-3,4-다이하이드로-2H-벤조[b][1,4]옥사진-6-일, 1-메틸-1H-피라졸로[3,4-b]피리딘-5-일, 1H-피라졸로[3,4-b]피리딘-5-일, 2,3-다이하이드로-[1,4]다이옥시노[2,3-b]피리딘-5-일, 1,3-다이옥솔로[4,5]피리딘-5-일, 1-옥소-1,3-다이하이드로아이소벤조푸란-5-일, 2,2-다이메틸벤조[d][1,3]다이옥소l-5-일, 2,3-다이하이드로벤조[b][1,4]다이옥신-6-일, 1-옥소아이소인돌린-5-일, 또는 2-메틸-1-옥소아이소인돌린-5-일, 1*H*-인다졸-5-일을 형성할 수 있고;

R_6은 수소, C_{1-4}알킬, 플루오로, 2-메톡시-에톡시, 클로로, 시아노 또는 트라이플루오로메틸이고;

R_7은 수소 또는 플루오로이되;

단, 화학식 (I)의 화합물은 하기 화합물 이외의 것임:

R_1이 아이소퀴놀린-8-일이고, R_2가 트라이플루오로메틸이고, G_1이 C(R_4)(여기서, R_4는 2*H*-1,2,3-트라이아졸-2-일임)이고, G_2가 N이고, R_5가 수소인 화합물;

R_1이 아이소퀴놀린-8-일이고, R_2가 트라이플루오로메틸이고, G_1이 C(R_4)(여기서, R_4는 *1H*-이미다졸-1-일임)이고, G_2가 N이고, R_5가 클로로인 화합물;

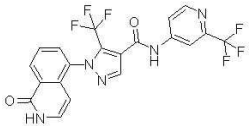
R_1이 아이소퀴놀린-8-일이고, R_2가 트라이플루오로메틸이고, G_1이 C(R_4)(여기서, R_4는 *1H*-1,2,3-트라이아졸-1-일임)이고, G_2가 N이고, R_5가 수소인 화합물;

R_1이 아이소퀴놀린-8-일이고, R_2가 트라이플루오로메틸이고, G_1이 C(R_4)(여기서, R_4는 수소임)이고, G_2가 N이고, R_5가 플루오로인 화합물).

소정 실시 형태에서, 본 발명에 유용한 MALT1 억제제뿐만 아니라 관련 정보, 예컨대 이의 구조, 생성, 생물학적 활성, 치료적 응용, 투여 또는 전달 등이 미국 특허 출원 공개 US20180170909호 및 국제 특허 출원 공개 WO 2018/119036호에 기재되어 있으며, 이들의 내용은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다.

일부 실시 형태에서, MALT1 억제제는 "화합물 A"이며, 화학식 (II)의 구조를 갖는 1-(1-옥소-1,2 다이하이드로아이소퀴놀린-5-일)-5 (트라이플루오로메틸)-N-[2 (트라이플루오로메틸)피리딘-4 yl]-1H-피라졸-4 카르복스아미드의 화합물, 또는 이의 용매화물, 호변이성질체, 또는 약제학적으로 허용되는 염을 지칭한다:

[화학식 (II)]



.

소정 실시 형태에서, 화합물 A는 화학식 (II)의 화합물의 1수화물 형태이다.

화합물 A는, 예를 들어 미국 특허 출원 공개 US20180170909호의 실시예 158에 기재된 바와 같이 제조될 수 있으며, 이는 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다. 실시예 158의 절차는 화학식 (II)의 화합물의 수화물 형태를 제공하는 것으로 확정되어 있다.

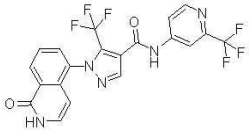
화합물 A는, 혼합형 기전으로 알로스테릭(allosteric) 부위에 결합하는, 경구로 생체이용가능한, 강력한, 그리고 선택적인 MALT1 억제제이다. 비임상 연구에서, 화합물 A는 시험관내에서 브루톤 티로신 키나제(BTK) C481S 또는 카스파타제 동원 도메인-함유 단백질 11(CARD11) 돌연변이를 보유하는 이브루티닙-저항성 DLBCL 세포주 및 분화 클러스터(CD) 79b-돌연변이 DLBCL의 성장을 억제하는 것으로 밝혀져 있으며, 생체내에서 CD79b 및 CARD11-돌연변이 ABC-DLBCL 이종이식편 모델에서 효능을 나타내고 있다. 1 μM 또는 10 μM 중 어느 하나의 단회 용량에서도, 화합물 A는 프로테아제, 카스파제, 단백질 키나제, 및 G-단백질-커플링된 수용체의 유의한 결합 억제를 나타내지 않았다.

화합물 A는 용매화물로서 존재할 수 있다. "용매화물"은 물을 갖는 용매화물(즉, 수화물) 또는 일반적인 유기 용매를 갖는 용매화물일 수 있다. 약제학적으로 허용되는 용매화물 - 상기 용매화물은 수화물을 포함하고, 상기 수화물은 1수화물을 포함함 - 의 사용은 본 발명의 범주 내에 있는 것으로 여겨진다.

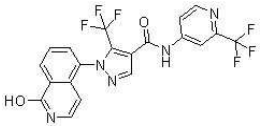
화합물 A는 비정질 형태 또는 용해된 상태로 제형화될 수 있으며, 예를 들어 그리고 제한 없이, 화합물 A는 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 중합체와 함께 비정질 형태로 제형화될 수 있다.

당업자는 화합물 A가 호변이성질체로서 존재할 수 있음을 인식할 것이다. 모든 호변이성질체 형태는, 구체적으로 지시되어 있지 않더라도, 화합물의 기의 하나의 가능한 호변이성질체 배열이 기재된 구조에 의해 포함되는 것으로 이해된다.

예를 들어,



는 하기 구조를 또한 포함함이 이해된다:



임의의 편리한 호변이성질체 배열이 화합물을 기재하는 데 이용될 수 있다.

MALT1 억제제는 임의의 적합한 약제학적 조성물로 대상체에게 투여될 수 있다. 그것은 임의의 적합한 결합제(들), 윤활제(들), 현탁화제(들), 코팅제(들), 가용화제(들), 및 이들의 조합과 혼합될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 화합물을 함유하는 고체 경구 투여 형태, 예를 들어 정제 또는 캡슐은 적절할 경우 한꺼번에 적어도 하나의 투여 형태로 투여될 수 있다. 화합물을 지속 방출 제형으로 투여하는 것이 또한 가능하다. 본 발명의 화합물이 투여될 수 있는 추가의 경구 형태는 엘릭서, 용액, 시럽, 및 현탁액을 포함하며; 이들 각각은 선택적으로 향미제 및 착색제를 함유한다. 대안적으로, MALT1 억제제는 흡입(기관내 또는 비강내)에 의해 또는 좌제 또는 페서리(pessary) 형태로 투여될 수 있거나, 이들은 로션, 용액, 크림, 연고 또는 살포성 분말(dusting powder) 형태로 국소 도포될 수 있다. 예를 들어, 이들은 폴리에틸렌 글리콜 또는 유동 파라핀의 수성 에멀젼을 포함하고/포함하거나, 이것으로 이루어지고/이루어지거나, 이것으로 본질적으로 이루어지는 크림 내로 도입될 수 있다. 이들은 또한 왁스 또는 연질 파라핀 베이스를 포함하고/하거나, 이것으로 이루어지고/이루어지거나, 이것으로 본질적으로 이루어지는 연고에 크림을 약 1 중량% 내지 약 10 중량%의 농도로, 필요에 따라 임의

의 안정제 및 방부제와 함께 도입될 수 있다. 대안적인 투여 수단은 피부 또는 경피 패치를 사용하는 경피 투여를 포함한다.

MALT1 억제제의 약제학적 조성물(뿐만 아니라 본 발명의 화합물 단독)은 또한 비경구적으로, 예를 들어 해면체내(intracavernosally), 정맥내, 근육내, 피하, 진피내 또는 수강내 주사될 수 있다. 이러한 경우에, 조성물은 또한 적합한 담체, 적합한 부형제, 및 적합한 희석제 중 적어도 하나를 포함할 것이다.

비경구 투여의 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 다른 물질, 예를 들어 용액을 혈액과 등장성으로 하기에 충분한 염 및 단당을 함유할 수 있는 멸균 수용액의 형태로 최상으로 사용된다. 협측 또는 설하 투여의 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 통상적인 방식으로 제형화될 수 있는 정제 또는 로젠지(lozenge)의 형태로 투여될 수 있다.

추가적인 예로서, MALT1 억제제, 예컨대 화학식 (I) 또는 화학식 (II)의 화합물을 활성 성분으로서 함유하는 약제학적 조성물은 통상적인 약제학적 배합 기법에 따라 화합물(들)을 약제학적으로 허용되는 담체, 약제학적으로 허용되는 희석제 및/또는 약제학적으로 허용되는 부형제와 혼합하여 제조될 수 있다. 담체, 부형제, 및 희석제는 요구되는 투여 경로(예를 들어, 경구, 비경구 등)에 따라 매우 다양한 형태를 취할 수 있다. 따라서, 현탁액, 시럽, 엘릭서 및 용액과 같은 액체 경구 제제의 경우, 적합한 담체, 부형제 및 희석제는 물, 글리콜, 오일, 알코올, 향미제, 방부제, 안정제, 착색제 등을 포함하며; 분말, 캡슐, 및 정제와 같은 고체 경구 제제의 경우, 적합한 담체, 부형제 및 희석제는 전분, 당, 희석제, 과립화제, 윤활제, 결합제, 붕해제 등을 포함한다. 고체 경구 제제는 또한 주요 흡수 및 붕해 부위를 조절하도록 하기 위하여 선택적으로 당과 같은 물질로 코팅되거나 장용 코팅될 수 있다. 비경구 투여의 경우, 담체, 부형제 및 희석제는 통상 멸균수를 포함할 것이며, 조성물의 용해성 및 보존성을 증가시키기 위하여 다른 성분들이 첨가될 수 있다. 주사용 현탁액 또는 용액은 또한 적절한 첨가제, 예컨대 안정제 및 방부제와 함께 수성 담체를 이용하여 제조될 수 있다.

화학식 (I) 또는 화학식 (II)의 화합물 또는 이의 약제학적 조성물의 치료적 유효량은 평균적인(70 kg) 인간의 경우 하루당 약 1 내지 약 4회의 계획(regimen)으로 약 0.1 mg 내지 약 3000 mg, 또는 그 안의 임의의 특정 양 또는 범위, 특히 약 1 mg 내지 약 1000 mg, 또는 그 안의 임의의 특정 양 또는 범위, 또는 더 특히 약 10 mg 내지 약 500 mg, 또는 그 안의 임의의 특정 양 또는 범위의 활성 성분의 용량 범위를 포함하지만; 화학식 (I)의 화합물의 치료적 유효량은 치료될 질병, 증후군, 질환, 및 장애에 따라 달라질 것임이 당업자에게 명백하다.

경구 투여의 경우, 약제학적 조성물은 바람직하게는 약 1.0, 약 10, 약 50, 약 100, 약 150, 약 200, 약 250, 및 약 500 밀리그램의 화학식 (I)의 화합물을 함유하는 정제의 형태로 제공된다.

본 발명의 일 실시 형태는 약 25 mg 내지 약 500 mg의 양의 화학식 (I)의 화합물을 포함하는 경구 투여용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

유리하게는, 화학식 (I)의 화합물은 일일 1회 용량으로 투여될 수 있거나, 총 일일 투여량은 일일 2회, 3회 및 4회의 분할 용량으로 투여될 수 있다.

투여되는 화학식 (I)의 화합물의 최적 투여량은 결정될 수 있으며, 사용되는 특정 화합물, 투여 방식, 제제의 강도, 및 질병, 증후군, 질환 또는 장애의 진행정도에 따라 달라질 것이다. 게다가, 대상체 성별, 연령, 체중, 식이 및 투여 시간을 비롯한 치료될 특정 대상체와 관련된 인자에 따라, 적절한 치료 수준 및 원하는 치료 효과를 달성하도록 용량을 조정해야 할 것이다. 따라서, 상기 투여량은 평균적인 경우의 예이다. 물론 더 많거나 더 적은 투여량 범위가 유익한 개별적인 경우가 있을 수 있으며, 그러한 경우도 본 발명의 범주 내에 있다.

MALT1 조절되는 유전자의 발현을 측정하기 위한 키트가 또한 본 명세서에 개시된다. 일부 실시 형태에서, 키트는

- 혈액 샘플 내의 PBMC를 자극하기 위한 하나 이상의 작용제;

- 하나 이상의 MALT1 조절되는 유전자, 바람직하게는 표 1 내지 표 4에서의 것들로부터 선택되는, 바람직하게는 PLAU, IL6, C3, IL8, VEGFA, CXCL5, CXCL3, DUSP4, IL24, CD22, PTGS2, CXCR4, IL10, PLAUR, IL12B, OSM, SLC11A1, EBI3, CXCL10, CXCL9, IL2, CCL8, FN1, MSR1, EGR2, IL21, TNFSF10, APOE, CXCL11, CMKLR1, CCL13, CXCL6, XCL2, SPP1, CD163, FCGR1A, SERPING1, TN, NF-κB2, TNFSF10, APOE, 및 PYCARD로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 MALT1 조절되는 유전자에 상보적인 올리고뉴클레오티드 및/또는 프라이머를 포함하며, 상기 올리고뉴클레오티드 및/또는 프라이머는 선택적으로 표지된다.

실시예

실시예 1: NFκB 핵 전좌 검정을 위한 T 세포 활성화 및 PBMC 단리

4개의 10 mL 헤파린 튜브에 림프종 공여자로부터 전혈의 샘플(40 mL)을 획득하였다. 샘플을 Conversant Bio(미국 앨라배마주 헌츠빌 소재) 수집 현장으로부터 주변 온도에서 하룻밤 동안 운송하였다. 그러나, 실험실에서의 후속 증거는 4℃에서의 운송이 세포의 반응성을 더 잘 보존할 수 있음을 시사하였다.

각각의 6.5 mL의 전혈 샘플을 2개의 50 mL 원추형 튜브(Corning, cat. # 430290; 미국 뉴욕주 코닝 소재)에 옮기고, 10% HI 소태아 혈청(FBS)(Life Technologies, cat. # 16140-071; 미국 캘리포니아주 칼스배드 소재)이 보충된, 25 mM HEPES(Life Technologies, cat. # 72400-047)를 함유하는 실온 1640 RPMI(Roswell Park Memorial Institute)와 1:1로 혼합하였다. 50 mL의 샘플이 함유된 원추형 튜브들 중 하나를 200 μM 화합물 A(200 mM 스톡; 1000X)로 처리하고, 나머지 다른 하나의 50 mL 원추형 튜브를 등가 부피의 비히클 대조 DMSO(Life Technologies, cat. # L34957)로 처리하였다. 두 튜브 모두를 잘 혼합하였다. 처리된 혈액 혼합물을 6-웰 폴리스티렌 배양 플레이트(Falcon, cat. # 353046)에 웰당 3 mL로 옮기고, 5% CO_2 하에서 37℃에서 가습된 인큐베이터 내에서 하룻밤 인큐베이션하였다.

하룻밤 인큐베이션 후에, 항-CD3(UCHT1 클론; BioLegend, cat. # 300465; 미국 캘리포니아주 샌 디에고 소재) 및 항-CD28(ANC28.1 클론; Ancell, cat. # 177-024; 캐나다 브리티시 콜럼비아 소재) 항체를 T 세포 자극을 필요로 하는 웰에 각각 1 ㎍/mL의 최종 농도(1 mg/mL 스톡; 1000X)로 첨가하였다. 용액을 1 mL 피펫을 사용하여 피펫팅함으로써 혼합하였다. 플레이트를 5% CO_2 하에서 37℃에서 가습된 인큐베이터 내에서 추가 6시간 동안 인큐베이션하였다.

인큐베이션 후에, 혈액 혼합물을 50 mL 원추형 튜브 내로 수집하고, 4℃에서 5분 동안 1,500 rpm으로 원심분리하였다. 조심스럽게, 1 내지 2 mL의 상층액(혈장과 배양 배지의 혼합물)을 수집하고, -80℃에서 작은 분취량으로 동결시켰다.

남아 있는 샘플 내의 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 밀도 구배 원심분리에 의해 단리하였다. 더 구체적으로는, 멸균 인산염 완충 식염수(PBS, Ca^{++}/Mg^{++} 무함유, ThermoFisher Scientific, cat. # 14190-144; 미국 매사추세츠주 월섬 소재)(10 mL)를 남아 있는 샘플에 첨가하고 혼합하여 혈액 세포를 재구성하였다. 이어서, 17 mL의 Ficoll Paque(GE Healthcare, cat. # 17-1440-03; 미국 일리노이주 시카고 소재)를 50 mL SepMate 튜브(STEMCELL Technologies; cat. # 85450; 캐나다 뱅쿠버 소재)의 하부 챔버에 첨가하고, 샘플 혼합물로 서서히 오버레이하였다. SepMate 튜브를, 제동을 가하면서, 4℃에서 10분 동안 2000 rpm으로 원심분리하였다. PBMC를 함유하는 상층액을 새로운 50 mL 원추형 튜브에 첨가하고, PBS로 1회 세척하였다. 상층액을 4℃에서 5분 동안 1,500 rpm으로 원심분리하였다.

PBMC 펠릿이 다량의 적혈구(RBC)를 함유한 경우, 펠릿을 10 mL의 1 x RBC 용해 완충액(Invitrogen, cat. # 00-4300-54; 미국 캘리포니아주 칼스배드 소재) 중에 재구성하고, 3분 동안 인큐베이션한 후, 4℃에서 5분 동안 1,500 rpm으로 원심분리하였다. 상층액을 흡인하여, 세포 펠릿이 온전하다는 것을 확실히 한다. 펠릿을 1 mL의 동결 배지(Life Technologies, cat. # 12648-010) 중에 재구성하고, 동결시키고, 나중의 NF-κB 핵 전좌의 분석을 위하여 액체 질소 중에 저장하였다. 대안적으로, 펠릿을 PBS 중에 재구성하고, 곧바로 NF-κB 핵 전좌 분석을 거쳤다.

실시예 2: 이미징 유세포측정에 의한 T 또는 B 세포에서의 NF-kB 핵 전좌

실험 조건으로 처리된 동결된 또는 신선한 세포를 획득하였다. 예를 들어, 혈액 샘플 중의 T 세포를 활성화시키고, 활성화된 T 세포를 함유하는 PBMC를 실시예 1에 기재된 방법을 사용하여 단리할 수 있었다. 대안적으로, 혈액 샘플 중의 PBMC를 활성화시키고, 단리 없이 곧바로 이미징 유세포 분석을 거쳤다. 샘플이 전혈인 경우, 이 실험에서는 각각의 시험에 대해 최소 1 mL의 혈액을 사용하였다. 그러나, 1 mL 미만의 전혈이 또한 이 검정에 사용될 수 있다. 샘플이 동결된 경우에는, 샘플을 37℃에서 해동시키고, 1350 rpm으로 5분 동안 원심분리하여 실온 PBS(Life Technologies, cat. # 14190-136) 중에 온화하게 세척하였다.

세포를 표면 마커, 예컨대 CD4(Miltenyi, cat. # 130-092-373; 독일 소재의 Bergisch Gladbach) 및 CD8(BioLegend, cat. # 301050)(T 세포에 대한 것) 또는 CD19(BioLegend, cat. # 302206)(B 세포에 대한 것)뿐만 아니라, FACS 염색 완충액(BD, cat. # 554657) 중 생존력 염료(Life Technologies, cat. # L10119)에 대해 실온에서 15분 동안 염색하였다. 세포를 실온에서 5분 동안 1350 rpm으로 원심분리하고, 상층액을 폐기하고,

세포를 FACS 완충액으로 세척하였다. 세포를 실온에서 5분 동안 1350 rpm으로 다시 원심분리하고, 상층액을 폐기하였다.

세포를 CytoFix 완충액, 4.2% 포름알데하이드(BD, cat. # 554655; 미국 뉴저지주 프랭클린 레이크스 소재) 중에서 암소에서 실온에서 15분 동안 고정시켰다. 고정된 세포를 3분 동안 1350 rpm으로 원심분리하고, 상층액을 폐기하고, 고정된 세포를 FACS 완충액으로 세척하였다. 고정된 세포를 실온에서 5분 동안 1350 rpm으로 다시 원심분리하고, 상층액을 폐기하였다.

세포를 실온 PBS 중 0.1% Triton® X-100 용액(VWR, cat. # 0694-1L; 미국 펜실베이니아주 라드너 소재) 중에서 투과화하였다. 샘플을 실온에서 인큐베이션하고, 5분 동안 광을 차폐하였다. 세포를 4℃에서 5분 동안 1800 rpm으로 원심분리하였다. 펠릿을 검사하고, 상층액을 폐기하였다.

세포를 1.5% BSA를 함유하는 차가운 FACS 완충액(Fraction V, 7.5% 용액; Life Technologies, cat. # 15260-037)으로 15분 동안 블로킹하였다. 이어서, 세포를 4℃에서 5분 동안 1800 rpm으로 원심분리하고, 상층액을 폐기하였다.

FACS 완충액 중에 50 ㎍/mL로 p50 항체(Clone 2J10D7; Novus, cat. #NB100-56583C) 및 훽스트 33342(Thermo Scientific, cat. # 62249)를 10 nM이 되게 희석시킴으로써 염색 용액을 제조하였다. 세포를 암소에서 실온에서 30분 동안 염색 용액 중에서 인큐베이션하였다. 세포를 실온에서 5분 동안 1350 rpm으로 원심분리함으로써 세척하고, 상층액을 폐기하고, 펠릿을 FACS 완충액 중에 재구성하였다. 세척 단계를 2회 반복하고, 세포를 25 μL의 PBS 중에 5 내지 20 x 10^6개의 세포/mL의 최종 농도로 PBS 중에 재현탁시켰다.

샘플을, 60X 배율을 사용하여, AMNIS® IMAGESTREAM® X Mark II 이미징 유세포측정기(MilliporeSigma, 미국 매사추세츠주 벌링턴 소재) 상에서 즉시 이미징하고, 내재화 모듈을 사용하여 IDEAS 소프트웨어에서 데이터를 분석하여, 예를 들어 p50의 핵 풍부화에 의해 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포 또는 CLL 세포의 빈도를 평가하였다.

NF-κB 핵 전좌는 또한, p65(NF-κB의 다른 하나의 하위단위)의 핵 풍부화의 측정에 대해 전술된 방법과 유사한 방법을 사용하여 p65 항체에 의한 p65의 핵 풍부화에 의해 측정될 수 있다.

실시예 3: 정상 환자 및 NHL 환자의 말초 전혈 샘플로부터의 T 세포에 대한 CD69 발현 분석

정상 공여자 및 NHL 공여자로부터의 말초 전혈을 200 μM 화합물 A로 처리하거나 비처리된 채로 두고, 37℃에서 하룻밤 인큐베이션하였다. 다음날, 혈액을 실시예 1에 기재된 바와 같이 6시간 동안 항-CD3 및 항-CD28 자극성 항체로 처리하거나 비처리된 채로 두었다. 자극성 항체로 처리한 후에, 적혈구를 다종(multi-species) 용해 완충액을 사용하여 용해시키고, 백혈구를 항-CD4 및 항-CD8 항체로 염색하여 T 세포 및 항-CD69 항체를 표지하여 조기 T 세포 활성화를 측정하였다. CD69-양성 T 세포($CD4^+$ 및 $CD8^+$)의 빈도를 IFC에 의해 측정하였다.

도 1a에 나타낸 바와 같이, 정상 혈액 샘플을 항-CD3 및 항-CD28 자극성 항체와 인큐베이션한 경우, $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포 상에서의 CD69의 표면 발현이 증가되었으며, 그러한 증가는 화합물 A에 의한 처리에 의해 영향을 받지 않았다. 그러나, 도 1b에 나타낸 바와 같이, NHL 혈액 샘플의 경우, 화합물 A에 의한 처리는 항-CD3 및 항-CD28 자극성 항체에 의해 활성화된 T 세포 상에서의 CD69의 표면 발현을 유의하게 억제하였다.

실시예 4: NHL 환자의 말초 전혈 샘플로부터의 T 세포에서의 NF-kB 핵 전좌

NHL 공여자로부터의 말초 전혈 샘플을 10% 열 불활성화된 소태아 혈청이 보충된, 25 mM HEPES를 함유하는 등부피의 실온 RPMI 1640과 혼합하고, 96웰 U-바닥 플레이트 내로 분취하고, 화합물 A의 일련의 희석물로 처리하였다. 이어서, 혈액 혼합물 샘플을 37℃에서 하룻밤 인큐베이션하였다. 다음날, 혼합물 샘플을 실시예 1에 기재된 것과 같은 절차에 따라 항-CD3 및 항-CD28 자극성 항체로 처리하였다. 6시간 인큐베이션 후에, 샘플 내의 적혈구를 다종 용해 완충액을 사용하여 용해시켰다. 백혈구를 CytoFix 완충액을 사용하여 고정시키고, 0.1% Triton X-100 용액을 사용하여 투과화하였다. 이어서, 세포를 항-CD4 및 항-CD8 항체로 염색하여 T 세포를 표지하고, 훽스트 33342로 염색하여 핵을 표지하고, 항-p105/p50(클론 2J10D7, Novus Biologicals)을 사용하여 NF-κB 하위단위를 표지하였다. 샘플을 ImageStreamX 상에서 분석하여, CD4 및 CD8 양성 T 세포에서의 NF-κB 핵 국재화를 평가하였다. 상대 전좌가 입증되었으며, 상응하는 IC_{50} 값을 비선형 회귀 적합을 사용하여 계산하였다.

항-CD3(UCHT1) 및 항-CD28(ANC28.1)이 정상 대상체 및 림프종 대상체로부터의 혈액 샘플 내의 T 세포를 활성화

시키는 것으로 나타났다(데이터는 제시되지 않음). TCR 및 CD28 경로는 MALT1 신호전달을 수반한다. 도 2에 나타낸 같이, 화합물 A는 투여량 의존적 방식(IC_{50} = 약 9.5 μM)으로 NHL 혈액 샘플에서의 CD3/CD28 자극에 의해 활성화된 T 세포에서 표준 NF-κB 신호전달, 예를 들어 NFκB 핵 전좌를 완전히 블로킹하였다.

실시예 5: 만성 림프구성 백혈병(CLL) 환자의 말초 전혈 샘플로부터의 B 세포에서의 NF-κB 핵 전좌

CLL 공여자로부터의 동결된 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 해동시키고, 37℃에서 6시간 동안 지시된 농도의 화합물 A와 함께 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 자극성 가용성 항-IgM $F(ab')_2$ 단편 항-IgM(Jackson ImmunoResearch cat. 109-006-129)으로 처리하거나 30분 동안 비처리된 채로 두었다. 대안적으로, B 세포는 또한 항-IgM 항체로 코팅된 비드에 의해 활성화될 수 있다. 자극 후에, PBMC를 CytoFix 완충액을 사용하여 고정시키고, 0.1% Triton X-100 용액을 사용하여 투과화하였다. 이어서, 세포를 항-CD19로 염색하여 B(CLL) 세포를 표지하고, 헥스트 33342로 염색하여 핵을 표지하고, 항-p105/p50으로 염색하여 NF-κB 하위단위를 표지하였다. 샘플을 ImageStreamX 상에서 분석하여, CD19-양성 T 세포에서의 NF-κB 핵 국재화를 평가하였다. p105/p50 염색 및 헥스트 33342 염색에 대한 전좌 지수(유사성 점수)를 보여주었다. Microsoft Excel에서 스튜던트 t-검정(Student's t-test)을 사용하여 통계학적 유의성을 결정하였다.

도 3에 나타낸 바와 같이, 항-IgM에 의한 PBMC의 자극은 CLL 혈액 샘플에서 활성화된 B 세포를 가져왔으며, 이는 p50의 핵 풍부화를 나타내었으며, 예를 들어 활성화된 B 세포는 세포질로부터 핵으로의 증가된 NF-κB 핵 전좌를 가졌다. 또한, 화합물 A는 활성화된 B 세포에서 NF-κB 핵 전좌를 억제한 것으로 나타났다.

실시예 6: CLL 환자의 전혈 샘플로부터의 B 세포 및 T 세포에서의 NF-κB 핵 전좌

CLL 공여자로부터의 동결된 PBMC를 해동시키고, 37℃에서 하룻밤 지시된 농도의 화합물 A와 함께 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 항-IgM으로 처리하거나 6시간 동안 비처리된 채로 두었다. 자극 후에, PBMC를 CytoFix 완충액을 사용하여 고정시키고, 0.1% Triton X-100 용액을 사용하여 투과화하였다. 이어서, 세포를 항-CD19로 염색하여 B(CLL) 세포를 표지하고, 항-CD4 및 항-CD8을 사용하여 T 세포를 표지하고, 헥스트 33342로 염색하여 핵을 표지하고, 항-p105/p50으로 염색하여 NF-kB 하위단위를 표지하였다. 샘플을 ImageStreamX 상에서 분석하여, B 세포 또는 T 세포에서의 NF-kB 핵 국재화를 평가하였다. NF-kB의 핵 풍부화를 갖는 세포의 빈도가 도 4 및 도 5에 나타나 있다. Microsoft Excel에서 스튜던트 t-검정을 사용하여 통계학적 유의성을 결정하였다.

화합물 A는 항-IgM에 의해 활성화된 B 세포에서는 NF-κB 핵 전좌를 억제하였지만, 항-IgM으로 처리된 T 세포에서는 그렇지 않은 것으로 나타났다. 그러나, 항-CD3/항-CD28로 처리된 CLL 혈액 샘플에서는 T 세포에서의 NF-kB 전좌가 화합물 A에 의해 억제되었다(데이터는 제시되지 않음).

실시예 7: 화합물 A로 처리된 NHL 및 CLL 샘플로부터의 전혈 샘플 상에서의 CXCL 10 발현 분석

NHL 및 CLL 환자의 용해된 전혈로부터의 MALT 억제제의 효과를 입증하기 위하여 유전자 발현 시그너처를 탐구하였다. 말초 혈액을 3명의 NHL 환자 및 2명의 CLL 환자로부터 수집하였다. 말초 혈액을 실온에서 하룻밤 정치되게 하고, 이어서 혈액을 화합물 A (200 μM) 또는 DMSO 대조군으로 24시간 동안 처리하였다. 이어서, 혈액을, 실시예 1에 기재된 것과 유사한 방법을 사용하여, CD3 및 CD28에 대해 단일클론 항체로 4시간 동안 자극하였다. 자극 전과 자극 후에, 처리된 혈액을 PAXgene 튜브(Qiagen; 독일 힐덴 소재)에 옮기고, RNA를 PAXgene RNA 키트를 사용하여 추출하였다. 제조자의 설명서에 따라 Pan-Cancer Immune Profiling 키트(NanoString; 미국 워싱턴 시애틀 소재)에서 전혈로부터 추출된 100 ng의 RNA를 사용하여 유전자 발현을 측정하였다.

도 6a 및 도 6b는 NHL(도 6a) 및 CLL(도 6b) 샘플에서 NF-κB 조절 유전자인 CXCL10의 발현 수준을 나타낸다. 항-CD3 및 항-CD28에 의한 혈액 샘플의 자극은 모든 NHL 및 CLL 환자로부터의 DMSO 대조 샘플(채워지지 않은 기호)에서 CXCL10의 상향조절을 가져온 반면, CXCL10의 자극 유도 상향조절은 MALT1 억제제(채워진 기호)의 존재하에서 억제되었다.

CXCL10의 발현은 대표적인 유전자로서 제공된다. 표 1 내지 표 4는 MALT 억제제에 의한 MALT1 억제의 지표로서 사용될 수 있는 추가의 유전자들의 목록을 나타낸다. 이들 표는 DMSO 대조군 대비 MALT 억제제로 처리된 샘플에서 2배 초과하여 상향조절 또는 하향조절된 유전자를 포함한다.

[표 1]

CLL 환자에서 MALT 억제제 처리에 의해 억제되는 유전자. 값은 MALT 억제제로 처리된 3 명의 CLL 공여자의 평균 발현을 DMSO 대조군으로 나눈 값의 log_2 배수 변화이다.

유전자 기호	유전자명	log2 배수 변화 MALTi/DMSO
CXCL10	C-X-C 모티프 케모카인 리간드 10(CXCL10)	-6.23761
FN1	피브로넥틴 1(FN1)	-3.4889
CXCL9	C-X-C 모티프 케모카인 리간드 9(CXCL9)	-3.47723
CXCL11	C-X-C 모티프 케모카인 리간드 11(CXCL11)	-2.80918
IL2	인터류킨 2(IL2)	-2.63871
CCL8	C-C 모티프 케모카인 리간드 8(CCL8)	-2.36569
CMKLR1	케메린 케모카인-유사 수용체 1(CMKLR1)	-2.28358
MSR1	대식세포 스캐빈저 수용체 1(MSR1)	-2.28117
EGR2	조기 성장 반응 2(EGR2)	-2.10529
CCL13	C-C 모티프 케모카인 리간드 13(CCL13)	-2.07811
IL21	인터류킨 21(IL21)	-1.80691
EGR1	조기 성장 반응 1(EGR1)	-1.80596
IL1RN	인터류킨 1 수용체 길항제(interleukin 1 receptor antagonist, IL1RN)	-1.79666
TNFSF10	종양 괴사 인자 수퍼패밀리 구성원 10(TNFSF10)	-1.7951
IL17B	인터류킨 17B(IL17B)	-1.7948
MRC1	만노스 수용체, C 유형 1(mannose receptor, C type 1, MRC1)	-1.71364
TNFRSF4	TNF 수용체 수퍼패밀리 구성원 4(TNFRSF4)	-1.70485
TNFSF13B	종양 괴사 인자 수퍼패밀리 구성원 13b(tumor necrosis factor superfamily member 13b, TNFSF13B)	-1.70337
APOE	아포지질단백질 E(APOE)	-1.64456
TNFRSF13B	TNF 수용체 수퍼패밀리 구성원 13B(TNFRSF13B)	-1.6006
IFNG	인터페론 감마(interferon gamma, IFNG)	-1.5641
C1QA	보체 C1q A 사슬(complement C1q A chain, C1QA)	-1.55822
CD36	CD36 분자(CD36)	-1.52077
CD244	CD244 분자(CD244)	-1.51962
CXCL6	C-X-C 모티프 케모카인 리간드 6(CXCL6)	-1.44853
CD163	CD163 분자(CD163)	-1.44637
CCL28	C-C 모티프 케모카인 리간드 28(CCL28)	-1.43101
ULBP2	UL16 결합 단백질 2(UL16 binding protein 2, ULBP2)	-1.42264
HAMP	헵시딘 항미생물 펩티드(hepcidin antimicrobial peptide, HAMP)	-1.42213
TNF	종양 괴사 인자(TNF)	-1.41737
IFIT2	테트라트라이코펩티드 반복체를 갖는 인터페론-유도 단백질 2(IFIT2)	-1.391
PPARG	퍼옥시좀 증식인자-활성화 수용체 감마(peroxisome proliferator activated receptor gamma, PPARG)	-1.37583
OAS3	2'-5'-올리고아데닐레이트 신테타제 3(2'-5'-oligoadenylate synthetase 3, OAS3)	-1.35311
CCL27	C-C 모티프 케모카인 리간드 27(CCL27)	-1.34408
BIRC5	배큘로바이러스 IAP 반복체-함유-5(baculoviral IAP repeat containing 5, BIRC5)	-1.33518
C9	보체 C9(C9)	-1.33089
AXL	AXL 수용체 티로신 키나제(AXL receptor tyrosine kinase, AXL)	-1.32852
MASP1	만난 결합 렉틴 세린 펩티다제 1(mannan binding lectin serine peptidase 1, MASP1)	-1.31123
MUC1	뮤신 1, 세포 표면 관련(mucin 1, cell surface associated, MUC1)	-1.25111
CD274	CD274 분자(CD274)	-1.24173
TLR8	톨-유사 수용체 8(TLR8)	-1.20602
CT45A1	암/고환 항원 패밀리 45 구성원 A1(cancer/testis antigen family 45 member A1, CT45A1)	-1.1704
NLRP3	NLR 패밀리 피린 도메인 함유 3(NLRP3)	-1.15735
CFD	보체 인자 D(CFD)	-1.14569
NOS2	산화질소 신타제 2(NOS2A)	-1.08816
CCR3	C-C 모티프 케모카인 수용체 3(CCR3)	-1.08522
CD70	CD70 분자(CD70)	-1.06972
BST2	골수 간질 세포 항원 2(bone marrow stromal cell antigen 2, BST2)	-1.06542
RELA	RELA 원발암유전자, NF-kB 하위단위(RELA proto-oncogene, RELA)	-1.06425
TPTE	텐신 상동성을 갖는 막관통 포스파타제(transmembrane phosphatase with tensin homology, TPTE)	-1.04304
IFI35	인터페론 유도 단백질 35(interferon induced protein 35, IFI35)	-1.02516
IL7	인터류킨 7(IL7)	-1.02351
MAGEA1	MAGE 패밀리 구성원 A1(MAGEA1)	-1.00155

[표 2]

CLL 환자에서 MALT 억제제 처리에 의해 상향조절되는 유전자. 값은 MALT 억제제로 처리된 3 명의 CLL 공여자의 평균 발현을 DMSO 대조군으로 나눈 값의 $\log_2$ 배수 변화이다.

유전자 기호	유전자명	log2 배수 변화 MALTi/DMSO
PLAU	플라스미노겐 활성화 인자, 우로키나제(PLAU)	3.725443
IL6	인터류킨 6(IL6)	2.489794
CXCL5	C-X-C 모티프 케모카인 리간드 5(CXCL5)	2.342973
C3	보체 C3(C3)	2.212404
CXCL3	C-X-C 모티프 케모카인 리간드 3(CXCL3)	2.199427
CXCL8	케모카인(C-X-C 모티프) 리간드 8(IL8)	2.116282
DUSP4	이중 특이성 포스파타제 4(DUSP4)	2.032355
VEGFA	혈관 내피 성장 인자 A(VEGFA)	1.960556
IFNB1	인터페론 베타 1(IFNB1)	1.934917
KIR3DS1	KIR_Inhibiting_Subgroup_1	1.841838
PLAUR	플라스미노겐 활성화 인자, 우로키나제 수용체(PLAUR)	1.811316
TREM1	골수계 세포 상에서 발현되는 촉발 수용체 1(triggering receptor expressed on myeloid cells 1, TREM1)	1.76384
IL1R2	인터류킨 1 수용체 유형 2(IL1R2)	1.691364
SERPINB2	세르핀 패밀리 B 구성원 2(SERPINB2)	1.651362
CXCL2	C-X-C 모티프 케모카인 리간드 2(CXCL2)	1.61791
IRAK2	인터류킨 1 수용체 관련 키나제 2(IRAK2)	1.594393
C3AR1	보체 C3a 수용체 1(complement C3a receptor 1, C3AR1)	1.566417
KIR3DL1	살해 세포 면역글로불린 유사 수용체, 3 개의 Ig 도메인 및 긴 세포질 테일 1(killer cell immunoglobulin like receptor, three Ig domains and long cytoplasmic tail 1, KIR3DL1)	1.487092
SLC11A1	용질 담체 패밀리 11 구성원 1(SLC11A1)	1.47976
CCRL2	C-C 모티프 케모카인 수용체 유사 2(CCRL2)	1.432187
JAML	연결 부착 분자 유사(junction adhesion molecule like,	1.421695

	AMICA)	
CCL23	C-C 모티프 케모카인 리간드 23(CCL23)	1.388691
IL1RAP	인터류킨 1 수용체 부속 단백질(interleukin 1 receptor accessory protein, IL1RAP)	1.373874
CCR4	C-C 모티프 케모카인 수용체 4(CCR4)	1.362528
TNFSF18	종양 괴사 인자 수퍼패밀리 구성원 18(TNFSF18)	1.33906
ATM	ATM 세린/트레오닌 키나제(ATM)	1.337823
MAGEA4	MAGE 패밀리 구성원 A4(MAGEA4)	1.337288
THBS1	트롬보스폰딘 1(thrombospondin 1, THBS1)	1.326325
LGALS3	갈렉틴 3(LGALS3)	1.297857
CCL3L1	C-C 모티프 케모카인 리간드 3 유사 1(CCL3L1)	1.216666
CEBPB	CCAAT/인핸서 결합 단백질 베타(CEBPB)	1.208096
IL1RL2	인터류킨 1 수용체 유사 2(interleukin 1 receptor like 2, IL1RL2)	1.194175
THBD	트롬보모듈린(THBD)	1.179067
IL24	인터류킨 24(IL24)	1.173913
ADORA2A	아데노신 A2a 수용체(ADORA2A)	1.172815
CXCR4	C-X-C 모티프 케모카인 수용체 4(CXCR4)	1.16789
LY9	림프구 항원 9(lymphocyte antigen 9, LY9)	1.166111
PPBP	전-혈소판 염기성 단백질(pro-platelet basic protein, PPBP)	1.151512
CCL16	C-C 모티프 케모카인 리간드 16(CCL16)	1.113953
IL15RA	인터류킨 15 수용체 하위단위 알파(IL15RA)	1.078907
IFNA8	인터페론 알파 8(interferon alpha 8, IFNA8)	1.071804
FCER1G	IgE 수용체의 Fc 단편 Ig(FCER1G)	1.068402
IFNGR1	인터페론 감마 수용체 1(IFNGR1)	1.058767
S100A8	S100 칼슘 결합 단백질 A8(S100 칼슘 결합 단백질 A8, S100A8)	1.028829
CD209	CD209 분자(CD209)	1.026092
TNFRSF14	TNF 수용체 수퍼패밀리 구성원 14(TNFRSF14)	1.018935
OSM	온코스타틴 M(OSM)	1.006489

[표 3]

NHL 환자에서 MALT 억제제 처리에 의해 억제되는 유전자. 값은 MALT 억제제로 처리된 3 명의 NHL 공여자의 평균 발현을 DMSO 대조군으로 나눈 값의 log_2 배수 변화이다.

유전자 기호	유전자명	log2 배수 변화 MALTi/DMSO
CXCL10	C-X-C 모티프 케모카인 리간드 10(CXCL10)	-7.44425
FN1	피브로넥틴 1(FN1)	-6.39939
CXCL9	C-X-C 모티프 케모카인 리간드 9(CXCL9)	-4.51545
CCL8	C-C 모티프 케모카인 리간드 8(CCL8)	-4.34886
MSR1	대식세포 스캐빈저 수용체 1(MSR1)	-3.86464
CXCL6	C-X-C 모티프 케모카인 리간드 6(CXCL6)	-3.66149
IL2	인터류킨 2(IL2)	-2.86532
XCL2	X-C 모티프 케모카인 리간드 2(XCL2)	-2.38716
SPP1	분비 인단백질 1(secreted phosphoprotein 1, SPP1)	-2.38647
CD163	CD163 분자(CD163)	-2.36691
FCGR1A	IgG 수용체의 Fc 단편 Ia(FCGR1A)	-2.33665
SERPING1	세르핀 패밀리 G 구성원 1(SERPING1)	-2.1882
APOE	아포지질단백질 E(APOE)	-2.14008
TNF	종양 괴사 인자(TNF)	-2.04196
IL21	인터류킨 21(IL21)	-1.98795
EGR2	조기 성장 반응 2(EGR2)	-1.8383
TNFRSF11A	TNF 수용체 수퍼패밀리 구성원 11a(TNFRSF11A)	-1.82103
DUSP6	이중 특이성 포스파타제 6(DUSP6)	-1.79174
NLRP3	NLR 패밀리 피린 도메인 함유 3(NLRP3)	-1.76735
TNFSF10	종양 괴사 인자 수퍼패밀리 구성원 10(TNFSF10)	-1.71238
TICAM2	톨-유사 수용체 어댑터 분자 2(toll like receptor adaptor molecule 2, TICAM2)	-1.70777
IRF8	인터페론 조절 인자 8(IRF8)	-1.65661
TNFRSF9	TNF 수용체 수퍼패밀리 구성원 9(TNFRSF9)	-1.64241
CXCL11	C-X-C 모티프 케모카인 리간드 11(CXCL11)	-1.63743
PDCD1LG2	프로그래밍된 세포사 1 리간드 2(PDCD1LG2)	-1.63696
CD36	CD36 분자(CD36)	-1.59397
HLA-DMB	주요 조직적합성 복합체, 클래스 II, DM 베타(major	-1.5632

	histocompatibility complex, class II, DM beta, HLA-DMB)	
CD86	CD86 분자(CD86)	-1.56006
FCGR2B	IgG 수용체의 Fc 단편 IIb(FCGR2B)	-1.54176
IRF1	인터페론 조절 인자 1(IRF1)	-1.53314
CMKLR1	케메린 케모카인-유사 수용체 1(CMKLR1)	-1.50087
CASP10	카스파제 10(CASP10)	-1.48884
CD274	CD274 분자(CD274)	-1.45834
CFD	보체 인자 D(CFD)	-1.45802
CAMP	카텔리시딘 항미생물 펩티드(cathelicidin antimicrobial peptide, CAMP)	-1.44664
FCER1A	IgE 수용체의 Fc 단편 Ia(FCER1A)	-1.42921
IFNL2	인터페론 람다 2(interferon lambda 2, IFNL2)	-1.42398
TNFSF8	종양 괴사 인자 수퍼패밀리 구성원 8(TNFSF8)	-1.41322
MBL2	만노스 결합 렉틴 2(mannose binding lectin 2, MBL2)	-1.38957
CD160	CD160 분자(CD160)	-1.36681
TNFRSF4	TNF 수용체 수퍼패밀리 구성원 4(TNFRSF4)	-1.33342
MEF2C	근세포 인핸서 인자 2C(myocyte enhancer factor 2C, MEF2C)	-1.33179
CCL7	C-C 모티프 케모카인 리간드 7(CCL7)	-1.28969
CCR2	C-C 모티프 케모카인 수용체 2(CCR2)	-1.27647
TAP1	수송체 1, ATP 결합 카세트 하위패밀리 B 구성원(transporter 1, ATP binding cassette subfamily B member, TAP1)	-1.24684
HLA-DMA	주요 조직적합성 복합체, 클래스 II, DM 알파(major histocompatibility complex, class II, DM alpha, HLA-DMA)	-1.22772
MS4A1	구성원 스패닝 4-도메인 A1(membrane spanning 4-domains A1, MS4A1)	-1.21431
STAT1	신호 전달물질 및 전사 활성화 인자 1(signal transducer and activator of transcription 1, STAT1)	-1.19315
A2M	알파-2-거대글로불린(alpha-2-macroglobulin, A2M)	-1.17568

CCL2	C-C 모티프 케모카인 리간드 2(CCL2)	-1.14876
MAGEA3	MAGE 패밀리 구성원 A3(MAGEA3)	-1.14205
C2	보체 C2(C2)	-1.11037
TLR8	톨-유사 수용체 8(TLR8)	-1.09767
FCGR3A	IgG 수용체의 Fc 단편 IIIa(FCGR3A)	-1.09554
PASD1	PAS 도메인 함유 1(PAS domain containing 1, PASD1)	-1.05537
ALCAM	활성화된 백혈구 세포 부착 분자(activated leukocyte cell adhesion molecule, ALCAM)	-1.05433
CXCL1	C-X-C 모티프 케모카인 리간드 1(CXCL1)	-1.03739
NUBP1	뉴클레오티드 결합 단백질 1(nucleotide binding protein 1, NUBP1)	-1.03215
CX3CR1	C-X3-C 모티프 케모카인 수용체 1(CX3CR1)	-1.02947
SPANXB1	SPANX 패밀리 구성원 B1(SPANXB1)	-1.02926
CD1D	CD1d 분자(CD1D)	-1.00708
LTB	림프독소 베타(lymphotoxin beta, LTB)	-1.00365

[표 4]

NHL 환자에서 MALT 억제제 처리에 의해 상향조절되는 유전자. 값은 MALT 억제제로 처리된 3 명의 NHL 공여자의 평균 발현을 DMSO 대조군으로 나눈 값의 $\log_2$ 배수 변화이다.

유전자 기호	유전자명	log2 배수 변화 MALT/DMSO
IL6	인터류킨 6(IL6)	4.424478
PLAU	플라스미노겐 활성화 인자, 우로키나제(PLAU)	4.346512
IL24	인터류킨 24(IL24)	4.090957
CD22	CD22 분자(CD22)	3.839703
CXCL8	케모카인(C-X-C 모티프) 리간드 8	3.002058
PTGS2	프로스타글란딘-엔도퍼옥사이드 신타제 2(prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2)	2.808481
CXCR4	C-X-C 모티프 케모카인 수용체 4(CXCR4)	2.599085
IL10	인터류킨 10(IL10)	2.584502
PLAUR	플라스미노겐 활성화 인자, 우로키나제 수용체(PLAUR)	2.258011
VEGFA	혈관 내피 성장 인자 A(VEGFA)	2.250191
IL12B	인터류킨 12B(IL12B)	2.207348
OSM	온코스타틴 M(OSM)	2.199139
SLC11A1	용질 담체 패밀리 11 구성원 1(SLC11A1)	2.137152
EBI3	엡스타인-바르 바이러스 유도 3(Epstein-Barr virus induced 3, EBI3)	2.05429
IL3RA	인터류킨 3 수용체 하위단위 알파(IL3RA)	1.998028
ADA	아데노신 데아미나제(adenosine deaminase, ADA)	1.912374
IRAK2	인터류킨 1 수용체 관련 키나제 2(IRAK2)	1.902267
CCL23	C-C 모티프 케모카인 리간드 23(CCL23)	1.874754
BAGE	B 흑색종 항원(B melanoma antigen, BAGE)	1.850765
IL19	인터류킨 19(IL19)	1.850424
CXCL2	C-X-C 모티프 케모카인 리간드 2(CXCL2)	1.825243
LGALS3	갈렉틴 3(LGALS3)	1.760822
TNFRSF8	TNF 수용체 수퍼패밀리 구성원 8(TNFRSF8)	1.709077
CCL3	C-C 모티프 케모카인 리간드 3(CCL3)	1.66063
C3	보체 C3(C3)	1.647978
CCL3L1	C-C 모티프 케모카인 리간드 3 유사 1(CCL3L1)	1.633286
CCL19	C-C 모티프 케모카인 리간드 19(CCL19)	1.557437
IFNGR1	인터페론 감마 수용체 1(IFNGR1)	1.550933
LIF	백혈병 억제 인자(leukemia inhibitory factor, LIF)	1.527946
IFIT1	테트라트라이코펩티드 반복체를 갖는 인터페론-유도 단백질 1(IFIT1)	1.524019
CCL24	C-C 모티프 케모카인 리간드 24(CCL24)	1.48059
ITGB3	인테그린 하위단위 베타 3(integrin subunit beta 3, ITGB3)	1.447969
IL23A	인터류킨 23 하위단위 알파(interleukin 23 subunit alpha, IL23A)	1.439153
CD83	CD83 분자(CD83)	1.411104
BCL6	B-세포 CLL/림프종 6(B-cell CLL/lymphoma 6, BCL6)	1.397515
CSF1	콜로니 자극 인자 1(CSF1)	1.396813
FCER1G	IgE 수용체의 Fc 단편 Ig(FCER1G)	1.386864
THBD	트롬보모듈린(THBD)	1.369203
VEGFC	혈관 내피 성장 인자 C(VEGFC)	1.346309
TFRC	트랜스페린 수용체(transferrin receptor, TFRC)	1.34324
SLAMF7	SLAM 패밀리 구성원 7(SLAM family member 7, SLAMF7)	1.333665
IL2RA	인터류킨 2 수용체 하위단위 알파(IL2RA)	1.317348
BCL2L1	BCL2 유사 1(BCL2L1)	1.253259
SELE	셀렉틴 E(SELE)	1.234141
S100B	S100 칼슘 결합 단백질 B(S100 calcium binding protein B, S100B)	1.233235
RORA	RAR 관련 고아 수용체 A(RAR related orphan receptor A, RORA)	1.21919
TNFRSF1B	TNF 수용체 수퍼패밀리 구성원 1B(TNFRSF1B)	1.218378
TNFSF15	종양 괴사 인자 수퍼패밀리 구성원 15(TNFSF15)	1.216164
CCRL2	C-C 모티프 케모카인 수용체 유사 2(CCRL2)	1.201969
ATM	ATM 세린/트레오닌 키나제(ATM)	1.197985

RUNX3	runt-관련 전사 인자 3(RUNX3);	1.176228
IFI27	인터페론 알파 유도성 단백질 27(interferon alpha inducible protein 27, IFI27)	1.171608
PRG2	프로테오글리칸 2, 전-호산구 주요 염기성 단백질(proteoglycan 2, pro eosinophil major basic protein, PRG2)	1.167997
CEBPB	CCAAT/인핸서 결합 단백질 베타(CEBPB)	1.163182
ITGA1	인테그린 하위단위 알파 1(integrin subunit alpha 1, ITGA1)	1.156243
CDH1	카드헤린 1(cadherin 1, CDH1)	1.137557
CCL22	C-C 모티프 케모카인 리간드 22(CCL22)	1.105017
LYN	LYN 원발암유전자, Src 패밀리 티로신 키나제(LYN proto-oncogene, Src family tyrosine kinase, LYN)	1.103615
NOS2	산화질소 신타제 2(NOS2A)	1.096731
IFNB1	인터페론 베타 1(IFNB1)	1.087681
KLRB1	살해 세포 렉틴 유사 수용체 B1(killer cell lectin like receptor B1, KLRB1)	1.085404
IL1R1	인터류킨 1 수용체 유형 1(IL1R1)	1.059275
FOS	Fos 원발암유전자, AP-1 전사 인자 하위단위(Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit, FOS)	1.046243
SELPLG	셀렉틴 P 리간드(selectin P ligand, SELPLG)	1.029262
CSF3	콜로니 자극 인자 3(CSF3)	1.020689
CCL13	C-C 모티프 케모카인 리간드 13(CCL13)	1.004443

실시예 8: 화합물 A로 처리된 NHL 샘플로부터의 정제된 T 세포 상에서의 IL2 발현 분석

비호지킨 림프종 환자로부터의 정제된 T-세포 및 PBMC로부터의 유전자 발현 시그너처를 이용하여 MALT 억제제의 효과를 분석하였다. 말초 혈액을 5명의 NHL 환자로부터 수집하고, 말초 혈액을 하룻밤 정치되게 하였다. 이어서, 말초 혈액을 MALT 억제제 또는 DMSO 대조군으로 24시간 동안 처리하였다. 이어서, 혈액을 CD3 및 CD28에 대한 단일클론 항체로 6시간 동안 자극하였다. 자극 전에 그리고 자극 후에, 피콜 밀도 구배를 사용하여, 처리된 혈액으로부터 PBMC를 정제하고, 제조자 프로토콜을 사용하여 CD3 비드(Miltenyi)를 사용하여 T-세포를 정제하였다. 정제된 세포를 RLTplus(Qiagen) 중에 용해시키고, AllPrep 키트(Qiagen)를 사용하여, 정제된 세포로부터 RNA를 추출하였다. 제조자의 설명서에 따라 Pan-Cancer Immune Profiling 키트(NanoString)에서 100 ng의 RNA를 사용하여 유전자 발현을 측정하였다.

도 7은 자극 전과 자극 후의 혈액의 T-세포 및 PBMC 분획에서의, NF-κB 조절 유전자인 IL2의 발현 수준을 나타낸다. DMSO 대조군(도 7, 상부 패널)에서는, 혈액의 자극이 대부분의 공여자에 대해 T-세포 및 PBMC 둘 모두에서 IL2의 상향조절을 가져오는 반면, IL2의 자극 유도 상향조절은 MALT 억제제(도 7, 하부 패널)의 존재 하에서 억제된다. 정제된 T 세포에서의 IL2 발현의 분석은 시험된 모든 환자 샘플로부터의 DMSO 대조 샘플에서 IL2 발현의 더 균일한 유도를 보여주었다. 이는, 소정의 마커 유전자, 예컨대 IL2의 경우, 자극 및 MALT 억제제 처리 후에 PBMC가 추가로 분리되어(예를 들어, T 세포가 정제되어) 유전자 발현 분석에 대한 더 재현가능한 결과를 제공할 수 있음을 나타낸다.

IL2 유전자는 대표적인 유전자로서 제공된다. 다른 마커 유전자의 발현이 CLL 또는 NHL 환자의 혈액 샘플로부터 정제된 T 세포에 대해 유사한 방식으로 분석될 수 있다.

실시예 9: PBMC의 자극 없이 화합물 A로 처리된 NHL 환자로부터 정제된 PBMC의 유전자 발현 분석

혈액 세포의 자극 없이 NHL 환자로부터 정제된 PBMC로부터의 유전자 발현 시그너처를 분석함으로써 MALT 억제제의 효과를 입증하였다. 말초 혈액을 5명의 NHL 환자로부터 수집하고, 말초 혈액을 하룻밤 정치되게 하였다. 이어서, 말초 혈액을 MALT 억제제 또는 DMSO 대조군으로 24시간 동안 처리하였다. 피콜 밀도 구배를 사용하여, 비자극된 혈액으로부터 PBMC를 정제하고, 제조자 프로토콜을 사용하여 CD3 비드(Miltenyi)를 사용하여 T-세포를 정제하였다. 정제된 세포를 RLTplus(Qiagen) 중에 용해시키고, AllPrep 키트(Qiagen)를 사용하여, 정제된 세포로부터 RNA를 추출하였다. 제조자의 설명서에 따라 Pan-Cancer Immune Profiling 키트(NanoString)에서 100 ng의 RNA를 사용하여 유전자 발현을 측정하였다. MALT 억제제 처리된 샘플과 DMSO 처리된 샘플 사이의 유전자 발현 시그너처를 비교하였다.

도 8a 내지 도 8d는 정제된 T-세포(도 8a 및 도 8b)에서 그리고 정제된 PBMC(도 8c 및 도 8d)에서 세포 자극의 부재 하에서 MALT 억제에 의해 억제된 유전자(예를 들어, NF-κB2(도 8a), TNFSF10(도 8b), APOE(도 8c), 및

PYCARD(도 8d))를 나타낸다. 이들 결과는 MALT1 억제제의 효능이 시험관내에서 T 세포 또는 PBMC의 추가의 자극 없이 환자의 혈액으로부터 정제된 T 세포 또는 PBMC로부터의 소정의 마커 유전자, 예컨대 NF-κB2, TNFSF10, APOE, 및 PYCARD에 대한 유전자 발현 분석에 의해 평가될 수 있음을 나타낸다. 그러나, 환자별 변동성이 큰 것으로 관찰되었다.

도 8a 내지 도 8d에 나타낸 유전자는 대표로서 제공된다. 다른 마커 유전자가 또한 CLL 또는 NHL 환자의 혈액 샘플로부터 정제된 T 세포 또는 PBMC에 대해 유사한 방식으로 분석될 수 있다.

실시예 10: 상이한 작용제에 의한 생체외 자극 시에 NHL 환자의 말초 혈액으로부터의 T 세포에서의 NF-kB 전좌

10명의 B-세포 NHL 환자의 전혈 샘플을, 혈액 샘플이 상이한 작용제, 예를 들어 CD3/CD28 또는 PMA/이오노마이신, 또는 대조군으로서의 PBS에 의한 자극을 받았을 때에 대해 시험하였다. 간략하게 말하면, NHL 공여자 혈액을 10 mL NaHep 튜브 내에 수집하고, 냉장 상태(콜드 팩(cold pack))로 수송하였다. 실험실에 도착 시에, 혈액의 분취물을 RPMI 1640 + 10% FBS 배지로 희석시키고, 화합물 A(100 μM) 또는 DMSO(대조군)로 2시간 동안 처리하였다. 이어서, 혈액을, 각각 1 ㎍/mL의 최종 농도의 항-CD3 항체(UCHT1 클론; BioLegend, cat. # 300465; 미국 캘리포니아주 샌 디에고 소재) 및 항-CD28 항체(ANC28.1 클론; Ancell, cat. # 177-024; 캐나다 브리티시 콜럼비아 소재) 또는 PMA(20 ng/mL) 및 이오노마이신(1 ㎍/mL)으로 4시간 동안 자극하거나, 또는 비자극된 채로 두었다(PBS 단독 대조군). 자극 후에, 혈액을 RBC 용해 완충액으로 용해시키고, 백혈구를 4.2% 파라포름알데하이드(PFA) 중에 고정시켰다. 고정 시에, 세포를 0.1% Triton X-100으로 투과화하고, 각각의 항체들을 사용하여 CD3, NF-kB(p65 및 p50/p105)에 대해 염색하고, 헥스트 33342로 핵을 염색하였다. 샘플을 ImageStream MkII(Luminex) 상에 수집하고, 이미지를 IDEAS 소프트웨어(Luminex)로 분석하였다.

T 세포에서의 델타 핵 지수를 비자극된 조건(대조군)과 자극된 조건(CD3/CD28 자극 또는 PMA/이오노마이신 자극)으로부터의 $CD3^+$ T 세포에서의 핵 지수의 중위값간의 차이를 계산함으로써 NF-kB 핵 전좌에 대해 얻었으며, 얻어진 값을 비자극된 샘플에서의 기저선 수준에 대해 보정하였다(도 9a 및 도 9b). 델타 핵 지수의 평균값을 대조군(DMSO 처리)에 대해 정규화하고, 억제의 백분율로서 표현하였다(도 9c 및 도 9d). 화합물 A로 처리된 세포에서의 NF-kB 전좌에 대한 델타 핵 지수 값을 DMSO로 처리된 세포에서의 NF-kB 전좌에 대한 델타 핵 지수 값에 대해 정규화함으로써 억제의 상대 백분율을 얻었다. 도 9c 및 도 9d에서의 데이터는 평균과 평균의 표준 오차이다.

이 연구의 결구는 MALT1 억제제(화합물 A)가 항-CD3 및 항-CD28 항체 또는 PMA 및 이오노마이신에 의해 활성화된 NHL 환자의 T 세포에서의 NF-kB 핵 전좌를 억제하였음을 나타내었다.

실시예 11: 말초 혈액이 림프구-자극제로 처리될 때의 MALTi 활성의 유전자 발현 시그너처.

상이한 작용제에 의한 T-세포의 자극이 상이한 최적의 유전자 발현 시그너처를 생성하여 MALT1 억제제의 활성을 입증할 수 있는 것이 가능하다. MALT1 억제제 활성의 강력한 유전자 시그너처를 얻기 위하여, CD3/CD28, PMA/이오노마이신, 또는 대조군으로서의 PBS로 자극된 9명의 NHL 환자의 전혈을 시험하였다. 간략하게 말하면, NHL 공여자 혈액을 10 mL 소듐 헤파린 튜브 내에 수집하고, 냉장 상태(콜드 팩)로 수송하였다. 실험실에 도착 시에, 혈액의 분취물을 RPMI + 10% FBS 배지로 희석시키고, 100 μM 화합물 A 또는 DMSO(대조군)로 2시간 동안 처리하였다. 이어서, 분취물을 CD3 및 CD28 항체(각각 1 ug/ml), PMA(20 ng/ml) 및 이오노마이신(1 ㎍/mL)으로 4시간 동안 자극하거나, 또는 비자극된 채로 두었다(PBS). 자극 후에, 처리된 혈액을 PAXgene 튜브(Qiagen; 독일 힐덴 소재)에 옮기고, RNA를 PAXgene RNA 키트를 사용하여 추출하였다.

제조자의 설명서에 따라 Pan-Cancer Immune Profiling 키트(NanoString; 미국 워싱턴 시애틀 소재)에서 전혈로부터 추출된 100 ng의 RNA를 사용하여 유전자 발현을 측정하였다. NanoString nSolver 소프트웨어를 사용하여 샘플들에 걸쳐 유전자 발현을 정규화하였다. Nanostring 유전자 발현 데이터의 분석을, 'limma' 패키지를 사용하여, R 통계학적 환경에서 수행하여, 소정 유전자가 어느 자극 조건 후에든 화합물 A의 존재 하에서 그들의 발현 수준에 있어서 유의하게 상이한지의 여부를 결정하였다. 간략하게 말하면, $\log_2$-스케일, 정규화된 NanoString 카운트를, 관련 벤자미니-호흐베르크(Benjamini-Hochberg, BH) 보정된 p-값과 함께, 선형 모델(원래 환자를 포함시킴) 및 조정된 t-통계량(moderated t-statistics)에 적합화하고, 공통값(common value)에 대한 표준 오차의 경험적 베이즈 조정(empirical Bayes moderation)에 의해 계산하였다.

하기의 유전자는, 샘플을 CD3/CD28 자극 후에 화합물 A로 처리하였을 때, 1.5 미만의 배수 변화 및 0.05 미만의 조정된 p-값을 가진 반면: IL2, TNFRSF18, CD40LG, ICOS, CCL4, CTLA4, CCL20, CCL1, TNFRSF4, CCL3L1, IL6,

CCL3, TNF, IL4, FEZ1, LTA, IL9, IFNG, IL3, IL1A, CCL8, CD163, CSF2, MRC1, IL22, 및 IL13; 하기의 유전자는 1.5 초과의 배수 변화 및 0.05 미만의 조정된 p-값을 가졌다: IL19, THBS1, ADA, 및 PECAM1.

PMA-자극된 샘플에서, 하기의 유전자는, 샘플이 화합물 A로 처리될 때, 미리 명시된 컷오프 수준으로 하향조절된 반면, ICOS, POU2F2, CCR4, 및 CTLA4; 어떠한 유전자도 유의하게 상향조절되지 않았다. 단지 PBS만으로 처리된 샘플의 분석은, (a) 하기의 유전자는 1.5 미만의 배수 변화 및 0.05 미만의 조정된 p-값을 가진 반면: SPP1 및 FN1, 하기의 유전자는 1.5 초과의 배수 변화 및 0.05 미만의 조정된 p-값을 갖는다는 것을 보여주었다: THBS1, SERPINB2, MME, 및 IL10.

이들 결과에 기초하여, PMA/이오노마이신 및 CD3/CD28 실험과 관련된 유전자들을 조합하고, 이어서 PBS-단독 실험과 관련된 임의의 유전자를 차감함으로써, MALT1 억제제로 처리되고, 이어서 림프구-자극제에 노출된 환자 샘플에서 차별적으로 발현되는 유전자들의 목록을 컴파일링하였다. 따라서, 하기 유전자들 중 하나 이상의 발현 수준에 기초하여, 말초 혈액이 림프구-자극제로 처리될 때의 MALT1 억제제 활성의 정도를 결정하는 데 분류- 및/또는 억제-기반 접근법이 사용될 수 있다: IL2, TNFRSF18, CD40LG, ICOS, CCL4, CTLA4, CCL20, CCL1, TNFRSF4, CCL3L1, IL6, CCL3, TNF, IL4, FEZ1, LTA, IL9, IFNG, IL3, IL1A, CCL8, CD163, CSF2, MRC1, IL22, IL13, POU2F2, CCR4, IL19, ADA, 및 PECAM1.

실시예 12: 임상 연구

표준 치료 선택지를 이전에 제공받았거나 이에 대해 부적격한 진행성 B-림프구성 악성종양을 갖는 성인 참가자에게 투여되는 화합물 A 단제요법의 안전성, PK, PD, 및 예비 임상 활성을 평가하기 위하여 최초의 인간 대상(first in human, FIH), 오픈-라벨, 다시설, 1상 연구를 수행한다. 화합물 A는 외래환자 기준으로 매일 1회 경구 투여될 것이다. 치료 투여 전체에 걸쳐, 안전성을 모니터링하기 위해서뿐만 아니라, 임상 활성, PK, 및 PD 종점을 평가하기 위해서 일상적인 연구 절차 및 실험실 평가가 수행될 것이다.

화합물 A의 약력학적 특성(PD)을 평가하기 위해 바이오마커 샘플이 수집될 것이다. 바이오마커 평가를 위해 수집된 샘플은, 예를 들어 일련의 혈액 샘플을 포함한다. 화합물 A에 의한 MALT1 억제의 효과를 결정하기 위하여, 샘플이 PD 마커에 대해 평가될 수 있다. 탐색용 바이오마커를 결정하기 위하여, 혈액으로부터의 면역세포 하위세트의 유세포측정-기반 평가가 또한 수행될 것이다. 기저선 평가를 위해 투여 전 사이클 1 일수 1에서 전혈이 수집될 것이다.

표적화된 유전자 패널을 사용하는 DNA 서열분석을 위해, 그리고 필요에 따라 전장 엑솜(whole exome) 서열분석을 위해 전혈 샘플이 사용될 것이다. 임상 반응의 예측 바이오마커 및 잠재적인 저항성 기전 - TNFAIP3/A20 결실 또는 돌연변이를 포함함 - 을 확인하기 위하여, 돌연변이 상태를 임상 반응과 상관시키는 후향적 분석이 수행될 것이다. CD79b 및 CARD11에서의 돌연변이에 대한 차세대 서열분석(next-generation sequencing, NGS) 분석을 사용하여 시험하기 위하여, DLBCL 코호트로부터의 모든 샘플이 중앙 실험실로 보내질 것이다. 현지 시험과 중앙 실험실의 결과 사이에 불일치가 있는 경우에 중앙 실험실의 결과가 최종인 것으로 간주될 것이다.

생체외 시험을 위해 의도된 혈액을, MALT1 억제제 치료를 거친 B-NHL 대상체로부터 10 mL 소듐 헤파린 튜브 내로 수집하고, 다음날 전달을 위하여 주위 온도에서 임상 연구 기관에 수송한다. 수령 시에, 혈액 샘플을 2개의 15 mL 원추형 튜브(Corning, cat. # 430052) 내로 균일하게 분취하고, 10% 열 불활성화된 소태아 혈청(Life Technologies, cat. # 16140-071)이 보충된, 25 mM HEPES(Life Technologies, cat. # 72400-047)를 함유하는 등부피의 실온 RPMI 1640 배지와 혼합한다. 하나의 튜브는 "자극된"으로 라벨링하고, 다른 하나는 "대조군"으로 라벨링한다.

항-CD3 항체(UCHT1 클론) 및 항-CD28 항체(ANC28.1 클론)를 각각 1 ㎍/mL의 최종 농도로 "자극된" 튜브에 첨가한다. 등가 부피의 비히클 대조군(dPBS, Life Technologies, cat. # 14190144)을 "대조군" 튜브에 첨가한다. 튜브를 단단히 캡핑하고, 수회 뒤집어서 잘 혼합한다. 튜브를 로커(rocker) 상에서 온화하게 혼합하면서 5% CO_2 하에서 37℃에서 가습된 인큐베이터 내에서 6시간 동안 인큐베이션한다.

인큐베이션 후에, 2.5 mL의 "자극된" 및 "대조군" 혈액 혼합물을 라벨링된 PAXgene 튜브(BD Biosciences, cat. # 762165; 미국 펜실베이니아주 플리머스 미팅 소재) 내로 옮기고, 1 mL의 "자극된" 및 "대조군" 혈액 혼합물을 라벨링된 Smart 튜브(Fisher Scientific, cat. # 501351690; 미국 매사추세츠주 월섬 소재) 내로 옮겨서, 각각의 조건에 대해 2개씩의 튜브를 생성하였다. 3회 뒤집어서 Smart 튜브 내에서 고정제(fixative)를 잘 혼합한다. PAXgene 튜브 및 Smart 튜브를 실온에서 10분 동안 벤치탑(benchtop) 상에서 인큐베이션한다. 이어서, 튜브를 -80℃ 냉동고 내로 즉시 옮긴다. 샘플 분석 시까지 내내 -80℃에서 또는 드라이아이스 상에서 샘플

을 유지한다.

생체외 시험을 위해 의도된 혈액을, MALT1 억제제 치료를 거친 CLL 대상체로부터 10 mL 소듐 헤파린 튜브 내로 수집하고, 다음날 전달을 위하여 주위 온도에서 임상 연구 기관에 수송한다. 수령 시에, 혈액 샘플을 2개의 15 mL 원추형 튜브 내로 균일하게 분취하고, 10% 열 불활성화된 소태아 혈청이 보충된, 25 mM HEPES를 함유하는 등부피의 실온 RPMI 1640 배지와 혼합한다. 하나의 튜브는 "자극된"으로 라벨링하고, 다른 하나는 "대조군"으로 라벨링한다. 항-인간 IgM(F(ab')2 단편, Jackson ImmunoResearch, cat. # 109-006-129)을 15 ㎍/mL의 최종 농도로 "자극된 " 튜브에 첨가한다. 등가 부피의 비히클 대조군(dPBS)을 "대조군" 튜브에 첨가한다. 튜브를 단단히 캡핑하고, 수회 뒤집어서 잘 혼합한다. 튜브를 로커 상에서 온화하게 혼합하면서 5% CO_2 하에서 37℃에서 가습된 인큐베이터 내에서 30분 동안 인큐베이션한다.

인큐베이션 후에, 2.5 mL의 "자극된" 및 "대조군" 혈액 혼합물을 라벨링된 PAXgene 튜브 내로 옮기고, 1 mL의 "자극된" 및 "대조군" 혈액 혼합물을 라벨링된 Smart 튜브 내로 옮겨서, 각각의 조건에 대해 2개씩의 튜브를 생성하였다. 3회 뒤집어서 Smart 튜브 내에서 고정제를 잘 혼합한다. PAXgene 튜브 및 Smart 튜브를 실온에서 10분 동안 벤치탑 상에서 인큐베이션한다. 이어서, 튜브를 -80℃ 냉동고 내로 즉시 옮긴다. 샘플 분석 시까지 내내 -80℃에서 또는 드라이아이스 상에서 샘플을 유지한다.

CLL 혈액 샘플을 또한, B-NHL 혈액 샘플에 대해 전술된 것과 유사한 방법을 사용하여, 항-인간 CD3 및 항-인간 CD28로 자극하여 말초 T 세포의 활성화를 유도할 수 있다.

활성화된 말초 T 세포 또는 순환 B-CLL 세포를 함유하는 샘플이 본 명세서에 기재된 방법에 따라 NF-κB 핵 전좌 검정 및/또는 마커 유전자 발현 검정에 사용될 것이다.

실시 형태

1. MALT1 억제제를 필요로 하는 대상체에서 상기 MALT1 억제제에 대한 반응을 예측하는 방법으로서,

(a) 상기 MALT1 억제제에 이전에 노출되었던 대상체의 시험 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계;

(b) 상기 MALT1 억제제에 이전에 노출되지 않았던 대상체의 대조 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계; 및

(c) (a)에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 (b)에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준과 비교하는 단계를 포함하며, 여기서 (a)에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준의 감소 또는 증가는 상기 대상체에서의 상기 MALT1 억제제에 대한 양성 반응으로 예측되는, 방법.

1a. 대상체에서 MALT1-매개 질병을 생체내에서 치료 및/또는 진단하는 방법에 사용하기 위한 MALT1 억제제로서,

상기 대상체는 상기 MALT1 억제제에 반응할 것으로 예측되며, 상기 예측은

(a) 상기 MALT1 억제제에 이전에 노출되었던 대상체의 시험 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계;

(b) 상기 MALT1 억제제에 이전에 노출되지 않았던 대상체의 대조 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계; 및

(c) (a)에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 (b)에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준과 비교하는 단계를 포함하는 방법에 의해 수행되며, 여기서 (a)에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준의 감소 또는 증가는 상기 대상체에서의 상기 MALT1 억제제에 대한 양성 반응으로 예측되는, MALT1 억제제.

2. MALT1 억제제 요법을 필요로 하는 대상체에서 진행 중인 MALT1 억제제 요법의 효능을 모니터링하는 방법으로서,

(a) MALT1 억제제에 이전에 노출되었던 대상체의 시험 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계;

(b) MALT1 억제제에 이전에 노출되지 않았던 대상체의 대조 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계; 및

(c) (a)에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 (b)에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준과 비교하는 단계를 포함하며, 여기서 (a)에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준의 감소 또는 증가는 상기 대상체에서의 상기 MALT1 억제제 요법의 효능을 나타내는, 방법.

2a. 대상체에서 MALT1-매개 질병을 생체내에서 치료 및/또는 진단하는 방법에 사용하기 위한 MALT1 억제제로서,

상기 대상체는 진행 중인 MALT1 억제제 요법의 효능에 대해 모니터링되며, 상기 모니터링은

(a) MALT1 억제제에 이전에 노출되었던 대상체의 시험 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계;

(b) MALT1 억제제에 이전에 노출되지 않았던 대상체의 대조 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계; 및

(c) (a)에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 (b)에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준과 비교하는 단계를 포함하는 방법에 의해 수행되며, 여기서 (a)에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준의 감소 또는 증가는 상기 대상체에서의 상기 MALT1 억제제 요법의 효능을 나타내는, MALT1 억제제.

3. 암 또는 MALT1-매개 질병의 치료를 필요로 하는 대상체에서 상기 암 또는 MALT1-매개 질병을 치료하는 방법으로서,

(a) MALT1 억제제에 이전에 노출되었던 대상체의 시험 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계;

(b) MALT1 억제제에 이전에 노출되지 않았던 대상체의 대조 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계;

(c) (a)에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 (b)에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준과 비교하는 단계; 및

(d) (a)에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준이 (b)보다 적다면 상기 대상체에게 더 낮은 용량의 MALT1 억제제를 투여하고, (a)에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준이 (b)와 동일하다면 상기 대상체에게 더 높은 용량의 MALT1 억제제를 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

3a. 대상체에서 암 또는 MALT1-매개 질병을 생체내에서 치료 및/또는 진단하는 방법에 사용하기 위한 MALT1 억제제로서,

상기 방법은

(a) MALT1 억제제에 이전에 노출되었던 대상체의 시험 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계;

(b) MALT1 억제제에 이전에 노출되지 않았던 대상체의 대조 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계;

(c) (a)에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 (b)에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준과 비교하는 단계를 포함하며,

상기 방법은 (d) (a)에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준이 (b)보다 적다면 상기 대상체에게 더 낮은 용량의 MALT1 억제제를 투여하고, (a)에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준이 (b)와 동일하다면 상기 대상체에게 더 높은 용량의 MALT1 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함하는, MALT1 억제제.

4. 암 또는 MALT1-매개 질병의 치료를 필요로 하는 대상체에서 상기 암 또는 MALT1-매개 질병을 치료하기 위한 약물 계획(drug regimen)을 설계하는 방법으로서,

(a) MALT1 억제제에 이전에 노출되었던 대상체의 시험 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계;

(b) MALT1 억제제에 이전에 노출되지 않았던 대상체의 대조 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계;

(c) (a)에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 (b)에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된

수준과 비교하는 단계; 및

(d) (a)에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준이 (b)와 동일하다면 상기 대상체에게 제2 치료제를 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

4a. 대상체에서 암 또는 MALT1-매개 질병을 생체내에서 치료 및/또는 진단하는 방법에 사용하기 위한 MALT1 억제제로서,

상기 MALT1 억제제를 위한 약물 계획이 설계되며, 상기 설계는

(a) MALT1 억제제에 이전에 노출되었던 대상체의 시험 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계;

(b) MALT1 억제제에 이전에 노출되지 않았던 대상체의 대조 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계;

(c) (a)에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 (b)에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준과 비교하는 단계를 포함하는 방법에 의해 수행되며,

상기 방법은 (a)에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준이 (b)와 동일하다면 상기 대상체에게 제2 치료제를 투여하는 단계를 추가로 포함하는, MALT1 억제제.

5. 암 또는 MALT1-매개 질병을 앓고 있는 대상체에서 MALT1 억제제의 용량 및/또는 투여 빈도를 변형시키는 방법으로서,

(a) 상기 MALT1 억제제에 이전에 노출되었던 대상체의 시험 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계;

(b) 상기 MALT1 억제제에 이전에 노출되지 않았던 대상체의 대조 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계;

(c) (a)에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 (b)에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준과 비교하는 단계; 및

(d) (a)에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준이 (b)보다 적다면 상기 MALT1 억제제의 투여 빈도를 감소시키고, (a)에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준이 (b)와 동일하다면 상기 MALT1 억제제의 투여 빈도를 증가시키는 단계를 포함하는, 방법.

5a. 대상체에서 암 또는 MALT1-매개 질병을 생체내에서 치료 및/또는 진단하는 방법에 사용하기 위한 MALT1 억제제로서,

상기 MALT1 억제제에 대한 용량 및/또는 투여 빈도가 변형되며, 상기 변형은

(a) 상기 MALT1 억제제에 이전에 노출되었던 대상체의 시험 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계;

(b) 상기 MALT1 억제제에 이전에 노출되지 않았던 대상체의 대조 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계;

(c) (a)에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 (b)에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준과 비교하는 단계를 포함하는 방법에 의해 수행되며,

상기 방법은 (a)에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준이 (b)보다 적다면 상기 MALT1 억제제의 투여 빈도를 감소시키고, (a)에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준이 (b)와 동일하다면 상기 MALT1 억제제의 투여 빈도를 증가시키는 단계를 추가로 포함하는, MALT1 억제제.

6. 실시 형태 1 내지 실시 형태 5 중 어느 하나의 방법에 있어서, 또는 실시 형태 1a 내지 실시 형태 5a 중 어느 하나의 MALT1 억제제에 있어서, 상기 대상체의 시험 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계는

a) 상기 시험 샘플의 제1 부분을 하나 이상의 자극제와 접촉시켜 자극된 시험 샘플을 획득하고, 상기 하나 이상의 자극제와 접촉되지 않은 상기 시험 샘플의 제2 부분을 비자극된 시험 샘플로서 유지하는 단계;

b) 상기 자극된 시험 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 제1 수준을 측정하는 단계;

c) 상기 비자극된 시험 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 제2 수준을 측정하는 단계로서, 상기 자극된 샘플로부터의 세포와 상기 비자극된 샘플로부터의 세포는 동일한 세포 유형을 갖는, 상기 단계; 및

d) MALT1 조절되는 유전자 발현의 제1 수준을 MALT1 조절되는 유전자 발현의 제2 수준과 비교함으로써 상기 시험 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 방법, 또는 상기 사용을 위한 MALT1 억제제.

7. 실시 형태 1 내지 실시 형태 5 중 어느 하나의 방법에 있어서, 또는 실시 형태 1a 내지 실시 형태 5a 중 어느 하나의 MALT1 억제제에 있어서, 상기 대상체의 대조 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계는

a) 상기 대조 샘플의 제1 부분을 하나 이상의 자극제와 접촉시켜 자극된 대조 샘플을 획득하고, 상기 하나 이상의 자극제와 접촉되지 않은 상기 대조 샘플의 제2 부분을 비자극된 대조 샘플로서 유지하는 단계;

b) 상기 자극된 대조 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 제3 수준을 측정하는 단계;

c) 상기 비자극된 대조 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 제4 수준을 측정하는 단계로서, 상기 자극된 샘플로부터의 세포와 상기 비자극된 샘플로부터의 세포는 동일한 세포 유형을 갖는, 상기 단계; 및

d) MALT1 조절되는 유전자 발현의 제3 수준을 MALT1 조절되는 유전자 발현의 제4 수준과 비교함으로써 상기 대조 샘플에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 방법, 또는 상기 사용을 위한 MALT1 억제제.

8. 실시 형태 3 내지 실시 형태 5 중 어느 하나의 방법에 있어서, 또는 실시 형태 3a 내지 실시 형태 5a 중 어느 하나의 MALT1 억제제에 있어서, 상기 암은 비호지킨 림프종, 미만성 거대 B-세포 림프종(DLBCL), 외투 세포 림프종(MCL), 여포성 림프종(FL), 점막-관련 림프 조직(MALT) 림프종, 변연부 림프종, T-세포 림프종, 호지킨 림프종, 버킷 림프종, 다발성 골수종, 만성 림프구성 백혈병(CLL), 림프아구성 T 세포 백혈병, 만성 골수원성 백혈병(CML), 소림프구성 림프종(SLL), 발덴스트룀 거대글로불린혈증, 림프아구성 T 세포 백혈병, 만성 골수원성 백혈병(CML), 모발상-세포 백혈병, 급성 림프아구성 T 세포 백혈병, 형질세포종, 면역아구성 대세포 백혈병, 거핵아구성 백혈병, 급성 거핵구성 백혈병, 전골수구성 백혈병, 적백혈병, 뇌(신경교종), 교아세포종, 유방암, 결직장암/결장암, 전립선암, 비소세포 폐암을 포함한 폐암, 위암, 자궁내막암, 흑색종, 췌장암, 간암, 신장암, 편평 세포 암종, 난소암, 육종, 골육종, 갑상선암, 방광암, 두경부암, 고환암, 유잉 육종, 횡문근육종, 수아세포종, 신경아세포종, 자궁경부암, 신세포암, 요로상피암, 외음부암, 식도암, 타액선암, 비인두암, 볼암, 구강암, 및 GIST(위장관 간질 종양)로부터 선택되는, 방법, 또는 상기 사용을 위한 MALT1 억제제.

9. 실시 형태 3 내지 실시 형태 5 중 어느 하나의 방법에 있어서, 또는 실시 형태 3a 내지 실시 형태 5a 중 어느 하나의 MALT1 억제제에 있어서, 상기 MALT1-매개 질병은 관절염, 염증성 장 질병, 위염, 강직성 척추염, 궤양성 결장염, 췌장염, 크론병, 셀리악병, 다발성 경화증, 전신 홍반성 루푸스, 루푸스 신염, 류머티스성 열, 통풍, 기관 이식 거부반응, 만성 동종이식편 거부반응, 급성 또는 만성 이식편-대-숙주 질병, 아토피성 피부염을 포함한 피부염, 피부근염, 건선, 베체트병, 포도막염, 중증 근무력증, 그레이브스병, 하시모토 갑상선염, 쇼그렌 증후군, 수포성 장애, 항체-매개 혈관염 증후군, 면역-복합체 혈관염, 알레르기성 장애, 천식, 기관지염, 만성 폐색성 폐 질병(COPD), 낭포성 섬유증, 폐렴, 부종, 색전증, 섬유증, 사르코이드증, 고혈압 및 기종을 포함한 폐 질병, 규폐증, 호흡 부전, 급성 호흡곤란 증후군, BENTA 질병, 베릴륨 중독, 및 다발성 근염으로부터 선택되는 면역학적 질병인, 방법, 또는 상기 사용을 위한 MALT1 억제제.

10. 실시 형태 6 또는 실시 형태 7에 있어서, 상기 하나 이상의 자극제는 IL-1α, IL-1β, TNF-α, 지질다당류(LPS), 외독소 B, 포르볼 미리스테이트 아세테이트(PMA)/이오노마이신, TLR 효능제, 항-CD3 항체, 항-CD8 항체, 항-IgM 항체, 및 이들의 조합으로부터 선택되는, 방법, 또는 상기 사용을 위한 MALT1 억제제.

11. 실시 형태 6 또는 실시 형태 7에 있어서, 상기 시험 샘플 또는 상기 대조 샘플은 약 1 내지 12시간, 약 1 내지 10시간, 약 1 내지 9시간, 또는 약 1 내지 8시간 동안 상기 자극제들 중 하나 이상과 접촉되는, 방법, 또는 상기 사용을 위한 MALT1 억제제.

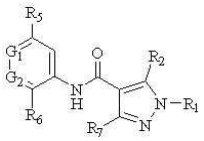
12. 실시 형태 6 또는 실시 형태 7에 있어서, 상기 대상체의 샘플에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현은 RNA 서열분석 검정, 유전자 발현 마이크로어레이, 또는 정량적 역전사 폴리머라제 연쇄 반응 검정(qRT-PCR)에 의해 측

정되는, 방법, 또는 상기 사용을 위한 MALT1 억제제.

13. 실시 형태 4의 방법에 있어서, 또는 실시 형태 4a의 MALT1 억제제에 있어서, 상기 제2 치료제는 BTK(브루톤 티로신 키나제) 억제제, SYK 억제제, PKC 억제제, PI3K 경로 억제제, BCL 패밀리 억제제, JAK 억제제, PIM 키나제 억제제, B 세포 항원-결합 항체, 항-PD1 항체, 항-PD-L1 항체, 및 이들의 조합으로부터 선택되는, 방법, 또는 상기 사용을 위한 MALT1 억제제.

14. 실시 형태 1 내지 실시 형태 7 중 어느 하나의 방법에 있어서, 또는 실시 형태 1a 내지 실시 형태 5a 중 어느 하나의 MALT1 억제제에 있어서, 상기 MALT1 억제제는 화학식 (I)의 화합물, 또는 이의 거울상이성질체, 부분입체 이성질체, 용매화물, 또는 약제학적으로 허용되는 염 형태인, 방법, 또는 상기 사용을 위한 MALT1 억제제:

[화학식 (I)]



(상기 식에서,

R_1은

i) 플루오로 또는 아미노 치환체로 선택적으로 치환된 나프탈렌-1-일;

및

ii) O, N, 및 S로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 함유하되, 1개의 헤테로원자만이 O 또는 S가 되는 9원 또는 10원 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되며; 여기서, ii)의 상기 헤테로아릴은 독립적으로 중수소, 메틸, 에틸, 프로필, 아이소프로필, 트라이플루오로메틸, 사이클로프로필, 메톡시메틸, 다이플루오로메틸, 1,1-다이플루오로에틸, 하이드록시메틸, 1-하이드록시에틸, 1-에톡시에틸, 하이드록시, 메톡시, 에톡시, 플루오로, 클로로, 브로모, 메틸티오, 시아노, 아미노, 메틸아미노, 다이메틸아미노, 4-옥소테트라하이드로푸란-2-일, 5-옥소피롤리딘-2-일, 1,4-다이옥사닐, 아미노카르보닐, 메틸카르보닐, 메틸아미노카르보닐, 옥소, 1-(t-부톡시카르보닐)아제티딘-2-일, N-(메틸)포름아미도메틸, 테트라하이드로푸란-2-일, 3-하이드록시-피롤리딘-1-일, 피롤리딘-2-일, 3-하이드록시아제티디닐, 아제티딘-3-일, 또는 아제티딘-2-일로부터 선택되는 1개 또는 2개의 치환체로 선택적으로 치환되고;

R_2는 C_{1-4}알킬, 1-메톡시-에틸, 다이플루오로메틸, 플루오로, 클로로, 브로모, 시아노, 및 트라이플루오로메틸로 이루어진 군으로부터 선택되고;

G_1은 N 또는 C(R_4)이고;

G_2는 N 또는 C(R_3)이되, 어느 경우에도 G_1 및 G_2 중 하나만이 N이 되고;

R_3은 독립적으로 트라이플루오로메틸, 시아노, C_{1-4}알킬, 플루오로, 클로로, 브로모, 메틸카르보닐, 메틸티오, 메틸설피닐, 및 메탄설포닐로 이루어진 군으로부터 선택되거나; 또는, G_1이 N일 때, R_3은 추가로 C_{1-4}알콕시카르보닐로부터 선택되고;

R_4는

i) G_2가 N일 때, 수소;

ii) C_{1-4}알콕시;

iii) 시아노;

iv) 사이클로프로필옥시;

v) 트라이아졸릴, 옥사졸릴, 아이소옥사졸릴, 피라졸릴, 피롤릴, 티아졸릴, 테트라졸릴, 옥사다이아졸릴, 이미다졸릴, 2-아미노-피리미딘-4-일, 2H-[1,2,3]트라이아졸로[4,5-c]피리딘-2-일, 2H-[1,2,3]트라이아졸로[4,5-

b]피리딘-2-일, 3H-[1,2,3]트라이아졸로[4,5-b]피리딘-3-일, 1H-[1,2,3]트라이아졸로[4,5-c]피리딘-1-일로 이루어진 군으로부터 선택되는 헤테로아릴 - 여기서, 상기 헤테로아릴은 옥소, C_{1-4}알킬, 카르복시, 메톡시카르보닐, 아미노카르보닐, 하이드록시메틸, 아미노메틸, (다이메틸아미노)메틸, 아미노, 메톡시메틸, 트라이플루오로메틸, 아미노(C_{2-4}알킬)아미노, 또는 시아노로부터 독립적으로 선택되는 1개 또는 2개의 치환체로 선택적으로 치환됨 -;

vi) 1-메틸-피페리딘-4-일옥시;

vii) 4-메틸-피페라진-1-일카르보닐;

viii) (4-아미노부틸)아미노카르보닐;

ix) (4-아미노)부톡시;

x) 4-(4-아미노부틸)-피페라진-1-일카르보닐;

xi) 메톡시카르보닐;

xii) 5-클로로-6-(메톡시카르보닐)피리딘-3-일아미노카르보닐;

xiii) 1,1-다이옥소-아이소티아졸리딘-2-일;

xiv) 3-메틸-2-옥소-2,3-다이하이드로-1H-이미다졸-1-일;

xv) 2-옥소피롤리딘-1-일;

xvi) (*E*)- (4-아미노부트-1-엔-1-일-아미노카르보닐;

xvii) 다이플루오로메톡시; 및

xviii) 모르폴린-4-일카르보닐로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R_5는 독립적으로 수소, 클로로, 플루오로, 브로모, 메톡시, 메틸설포닐, 시아노, C_{1-4}알킬, 에티닐, 모르폴린-4-일, 트라이플루오로메틸, 하이드록시에틸, 메틸카르보닐, 메틸설피닐, 3-하이드록시-피롤리딘-1-일, 피롤리딘-2-일, 3-하이드록시아제티디닐, 아제티딘-3-일, 아제티딘-2-일, 메틸티오, 및 1,1-다이플루오로에틸로 이루어진 군으로부터 선택되거나;

또는 R_4와 R_5는 함께 결합되어 8-클로로-4-메틸-3-옥소-3,4-다이하이드로-*2H*-벤조[*b*][1,4]옥사진-6-일, 8-클로로-3-옥소-3,4-다이하이드로-*2H*-벤조[*b*][1,4]옥사진-6-일, 2-메틸-1-옥소-1,2,3,4-테트라하이드로아이소퀴놀린-7-일, 4-메틸-3-옥소-3,4-다이하이드로-2H-벤조[b][1,4]옥사진-6-일, 3-옥소-3,4-다이하이드로-2H-벤조[b][1,4]옥사진-6-일, 1-메틸-1H-피라졸로[3,4-b]피리딘-5-일, 1H-피라졸로[3,4-b]피리딘-5-일, 2,3-다이하이드로-[1,4]다이옥시노[2,3-b]피리딘-5-일, 1,3-다이옥솔로[4,5]피리딘-5-일, 1-옥소-1,3-다이하이드로아이소벤조푸란-5-일, 2,2-다이메틸벤조[d][1,3]다이옥소l-5-일, 2,3-다이하이드로벤조[b][1,4]다이옥신-6-일, 1-옥소아이소인돌린-5-일, 또는 2-메틸-1-옥소아이소인돌린-5-일, 1*H*-인다졸-5-일을 형성할 수 있고;

R_6은 수소, C_{1-4}알킬, 플루오로, 2-메톡시-에톡시, 클로로, 시아노 또는 트라이플루오로메틸이고;

R_7은 수소 또는 플루오로이되;

단, 화학식 (I)의 화합물은 하기 화합물 이외의 것임:

R_1이 아이소퀴놀린-8-일이고, R_2가 트라이플루오로메틸이고, G_1이 C(R_4)(여기서, R_4는 2*H*-1,2,3-트라이아졸-2-일임)이고, G_2가 N이고, R_5가 수소인 화합물;

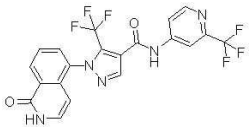
R_1이 아이소퀴놀린-8-일이고, R_2가 트라이플루오로메틸이고, G_1이 C(R_4)(여기서, R_4는 *1H*-이미다졸-1-일임)이고, G_2가 N이고, R_5가 클로로인 화합물;

R_1이 아이소퀴놀린-8-일이고, R_2가 트라이플루오로메틸이고, G_1이 C(R_4)(여기서, R_4는 *1H*-1,2,3-트라이아졸-1-일임)이고, G_2가 N이고, R_5가 수소인 화합물;

R_1이 아이소퀴놀린-8-일이고, R_2가 트라이플루오로메틸이고, G_1이 C(R_4)(여기서, R_4는 수소임)이고, G_2가 N이고, R_5가 플루오로인 화합물).

15. 실시 형태 14에 있어서, 상기 MALT1 억제제는 화학식 (II)로 나타낸 1-(1-옥소-1,2 다이하이드로아이소퀴놀린-5-일)-5 (트라이플루오로메틸)-N-[2 (트라이플루오로메틸)피리딘-4-일]-1H-피라졸-4 카르복스아미드, 또는 이의 용매화물, 호변이성질체, 또는 약제학적으로 허용되는 염인, 방법, 또는 상기 사용을 위한 MALT1 억제제:

[화학식 (II)]



.

16. 암 또는 MALT1-매개 질병의 치료를 필요로 하는 대상체에서 상기 암 또는 MALT1-매개 질병을 치료하는 방법으로서, 또는 대상체에서 암 또는 MALT1-매개 질병을 치료하는 방법에 사용하기 위한 MALT1 억제제로서,

상기 방법은

a) 대상체의 시험 혈액 샘플의 제1 부분을 하나 이상의 자극제와 접촉시켜 자극된 샘플을 획득하고, 상기 하나 이상의 자극제와 접촉되지 않은 대상체의 시험 혈액 샘플의 제2 부분을 비자극된 샘플로서 유지하는 단계로서, 상기 시험 혈액 샘플은 MALT1 억제제에 이전에 노출되었던, 상기 단계;

b) 상기 자극된 샘플의 PBMC에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 제1 수준을 측정하는 단계;

c) 상기 비자극된 샘플의 PBMC에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 제2 수준을 측정하는 단계로서, 상기 비자극된 샘플 내의 PBMC와 상기 자극된 샘플 내의 PBMC는 동일한 세포 유형을 갖는, 상기 단계;

d) 상기 제1 수준을 상기 제2 수준과 비교하여 상기 시험 혈액 샘플에서의 NF-κB 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 얻는 단계;

e) 상기 시험 혈액 샘플에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 대조 혈액 샘플에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준과 비교하는 단계, 및

f) 상기 시험 샘플이 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준의 감소 또는 증가를 나타내지 않는다면, 상기 대상체에게 MALT1 억제제의 용량을 약 1 mg 내지 약 1000 mg으로 투여하는 단계를 포함하는, 방법 또는 MALT1 억제제.

17. 암 또는 MALT1-매개 질병을 앓고 있는 대상체에서 MALT1 억제제의 용량 및/또는 투여 빈도를 변형시키는 방법으로서, 또는 대상체에서 암 또는 MALT1-매개 질병을 치료하는 방법에 사용하기 위한 MALT1 억제제로서,

상기 MALT1 억제제에 대한 용량 및/또는 투여 빈도가 변형되며, 상기 변형은

a) 대상체의 시험 혈액 샘플의 제1 부분을 하나 이상의 자극제와 접촉시켜 자극된 샘플을 획득하고, 상기 하나 이상의 자극제와 접촉되지 않은 대상체의 시험 혈액 샘플의 제2 부분을 비자극된 샘플로서 유지하는 단계로서, 상기 시험 혈액 샘플은 MALT1 억제제에 이전에 노출되었던, 상기 단계;

b) 상기 자극된 샘플의 PBMC에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 제1 수준을 측정하는 단계;

c) 상기 비자극된 샘플의 PBMC에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 제2 수준을 측정하는 단계로서, 상기 비자극된 샘플 내의 PBMC와 상기 자극된 샘플 내의 PBMC는 동일한 세포 유형을 갖는, 상기 단계;

d) 상기 제1 수준을 상기 제2 수준과 비교하여 상기 시험 혈액 샘플에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 얻는 단계;

e) 상기 시험 혈액 샘플에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준을 대조 혈액 샘플에서의 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준과 비교하는 단계, 및

f) 상기 시험 샘플이 MALT1 조절되는 유전자 발현의 변화된 수준의 감소 또는 증가를 나타내지 않는다면, 상기 대상체에게 MALT1 억제제의 유효량을 약 1 mg/일 내지 약 1000 mg/일로 투여하는 단계를 포함하는 방법에 의해 수행되는, 방법 또는 MALT1 억제제.

18. MALT1-매개 질병의 치료를 필요로 하는 인간 대상체에서 MALT1 억제제의 약력학적 효과를 평가하는 방법으로서,

상기 대상체의 자극된 샘플 또는 상기 자극된 샘플의 단리된 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)에서의 하나 이상의 MALT1 조절되는 유전자의 발현의 상기 MALT1 억제제에 의한 상향조절 또는 억제를 검출하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 자극된 샘플은 상기 상향조절 또는 억제의 검출 전에 시험관내에서 상기 대상체의 혈액 샘플을 하나 이상의 자극제로 처리함으로써 획득되는, 방법.

19. 인간 대상체에서 MALT1-매개 질병을 치료하는 방법에 사용하기 위한 MALT1 억제제로서,

상기 MALT1 억제제는 상기 대상체에서 효능이 있는 것으로 결정되거나, 또는 상기 대상체는 상기 MALT1 억제제에 반응할 것으로 결정되며, 상기 결정은

상기 대상체의 자극된 샘플 또는 상기 자극된 샘플의 단리된 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)에서의 하나 이상의 MALT1 조절되는 유전자의 발현의 상기 MALT1 억제제에 의한 상향조절 또는 억제를 검출하는 단계를 포함하는 방법에 의해 수행되며, 여기서 상기 자극된 샘플은 상기 상향조절 또는 억제의 검출 전에 시험관내에서 상기 대상체의 혈액 샘플을 하나 이상의 자극제로 처리함으로써 획득되며,

여기서, 상기 상향조절 또는 억제가 검출된다면, 상기 MALT1 억제제는 상기 대상체에서 상기 MALT1-매개 질병을 치료하는 데 효능이 있는 것으로 결정되거나, 또는 상기 대상체는 상기 MALT1 억제제에 의한 치료에 반응하는 것으로 결정되는, MALT1 억제제.

20. MALT1-매개 질병의 치료를 필요로 하는 대상체에서 MALT1 억제제의 약력학적 효과를 평가하는 방법으로서,

a) 하나 이상의 자극제를 상기 대상체의 혈액 샘플의 제1 부분에 투여함으로써 자극된 샘플을 획득하고, 비자극된 샘플로서 상기 하나 이상의 자극제가 투여되지 않은 상기 혈액 샘플의 제2 부분을 유지하는 단계로서, 상기 MALT1 억제제는 상기 대상체에게 또는 상기 대상체의 혈액 샘플에 투여되었던, 상기 단계;

b) 상기 자극된 샘플 또는 상기 자극된 샘플의 단리된 PBMC에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 제1 수준을 측정하는 단계;

c) 상기 비자극된 샘플 또는 상기 비자극된 샘플의 단리된 PBMC에서 상기 MALT1 조절되는 유전자의 발현의 제2 수준을 측정하는 단계로서, 상기 비자극된 샘플의 단리된 PBMC는 상기 자극된 샘플의 단리된 PBMC와 동일한 세포 유형을 갖는, 상기 단계;

d) 상기 제1 수준을 상기 제2 수준과 비교함으로써, 상기 MALT1 억제제의 존재 하에서 상기 하나 이상의 자극제에 의한 자극 시에 상기 자극된 샘플 또는 상기 자극된 샘플의 단리된 PBMC에서 상기 NF-κB 조절되는 유전자의 발현의 변화된 수준을 결정하는 단계; 및

e) 대조군과 상기 변화된 수준을 비교하여 상기 자극된 샘플 또는 상기 자극된 샘플의 단리된 PBMC에서의 상기 MALT1 조절되는 유전자의 발현의 상기 MALT1 억제제에 의한 상향조절 또는 억제를 검출하는 단계를 포함하며,

여기서, 상기 상향조절 또는 억제가 검출된다면, 상기 MALT1 억제제는 상기 대상체에서 상기 MALT1-매개 질병을 치료하는 데 효능이 있는 것으로 결정되거나, 또는 상기 대상체는 상기 MALT1 억제제에 의한 치료에 반응하는 것으로 결정되는, 방법.

21. 인간 대상체에서 MALT1-매개 질병을 생체내에서 치료 및/또는 진단하는 방법에 사용하기 위한 MALT1 억제제로서,

상기 MALT1 억제제는 상기 대상체에서 효능이 있는 것으로 결정되거나, 또는 상기 대상체는 상기 MALT1 억제제에 반응할 것으로 결정되며, 상기 결정은

a) 하나 이상의 자극제를 상기 대상체의 혈액 샘플의 제1 부분에 투여함으로써 자극된 샘플을 획득하고, 비자극된 샘플로서 상기 하나 이상의 자극제가 투여되지 않은 상기 혈액 샘플의 제2 부분을 유지하는 단계로서, 상기 MALT1 억제제는 상기 대상체에게 또는 상기 대상체의 혈액 샘플에 투여되었던, 상기 단계;

b) 상기 자극된 샘플 또는 상기 자극된 샘플의 단리된 PBMC에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 제1 수준을 측정하는 단계;

c) 상기 비자극된 샘플 또는 상기 비자극된 샘플의 단리된 PBMC에서 상기 MALT1 조절되는 유전자의 발현의 제2

수준을 측정하는 단계로서, 상기 비자극된 샘플의 단리된 PBMC는 상기 자극된 샘플의 단리된 PBMC와 동일한 세포 유형을 갖는, 상기 단계;

d) 상기 제1 수준을 상기 제2 수준과 비교함으로써, 상기 MALT1 억제제의 존재 하에서 상기 하나 이상의 자극제에 의한 자극 시에 상기 자극된 샘플 또는 상기 자극된 샘플의 단리된 PBMC에서 상기 MALT1 조절되는 유전자의 발현의 변화된 수준을 결정하는 단계; 및

e) 대조군과 상기 변화된 수준을 비교하여 상기 자극된 샘플 또는 상기 자극된 샘플의 단리된 PBMC에서의 상기 MALT1 조절되는 유전자의 발현의 상기 MALT1 억제제에 의한 상향조절 또는 억제를 검출하는 단계를 포함하는 방법에 의해 수행되며,

여기서, 상기 상향조절 또는 억제가 검출된다면, 상기 MALT1 억제제는 상기 대상체에서 상기 MALT1-매개 질병을 치료하는 데 효능이 있는 것으로 결정되거나, 또는 상기 대상체는 상기 MALT1 억제제에 의한 치료에 반응하는 것으로 결정되는, MALT1 억제제.

22. 실시 형태 20의 방법에 있어서, 또는 실시 형태 21의 MALT1 억제제에 있어서, 상기 대조군은 상기 MALT1 억제제의 부재 하에서 상기 하나 이상의 자극제에 의한 자극 시에 자극된 대조 샘플 또는 상기 자극된 대조 샘플의 단리된 PBMC에서의 상기 MALT1 조절되는 유전자의 발현의 변화된 수준에 상응하고, 바람직하게는 상기 대조군은

a) 상기 하나 이상의 자극제를 상기 대상체의 대조 혈액 샘플의 제1 부분에 투여함으로써 자극된 대조 샘플을 획득하고, 비자극된 대조 샘플로서 상기 하나 이상의 자극제가 투여되지 않은 상기 대조 혈액 샘플의 제2 부분을 유지하는 단계로서, 상기 MALT1 억제제는 생체내 또는 시험관내 중 어느 하나에서도 상기 대조 혈액 샘플에 투여되지 않았던, 상기 단계;

b) 상기 자극된 대조 샘플 또는 상기 자극된 대조 샘플의 단리된 PBMC로부터의 상기 MALT1 조절되는 유전자의 발현의 제3 수준을 측정하는 단계;

c) 상기 비자극된 대조 샘플 또는 상기 비자극된 대조 샘플의 단리된 PBMC로부터의 상기 MALT1 조절되는 유전자의 발현의 제4 수준을 측정하는 단계로서, 상기 비자극된 대조 샘플의 단리된 PBMC는 상기 자극된 대조 샘플의 단리된 PBMC와 동일한 세포 유형을 갖는, 상기 단계; 및

d) 상기 제3 수준을 상기 제4 수준과 비교함으로써, 상기 MALT1 억제제의 부재 하에서 상기 하나 이상의 자극제에 의한 자극 시에 상기 자극된 대조 샘플 또는 상기 자극된 대조 샘플의 단리된 PBMC에서 상기 MALT1 조절되는 유전자의 발현의 변화된 수준을 결정하는 단계를 포함하는 방법에 의해 측정되는, 방법, 또는 상기 사용을 위한 MALT1 억제제.

23. 실시 형태 18 내지 실시 형태 22 중 어느 하나에 있어서, 상기 MALT1-매개 질병은 림프종, 예컨대 비호지킨 림프종(NHL), 바람직하게는 미만성 거대 B-세포 림프종(DLBCL), 더 바람직하게는 DLBCL의 활성화된 B-세포-유사(ABC) 아형이거나, 또는 상기 MALT1-매개 질병은 백혈병, 바람직하게는 만성 림프구성 백혈병(CLL)인, 방법, 또는 상기 사용을 위한 MALT1 억제제.

24. 실시 형태 18 내지 실시 형태 22 중 어느 하나에 있어서, 상기 MALT1 조절되는 유전자는 표 2 및 표 4에서의 것들로 이루어진 군, 바람직하게는 PLAU, IL6, C3, IL8, VEGFA, CXCL5, CXCL3, DUSP4, IL24, CD22, PTGS2, CXCR4, IL10, PLAUR, IL12B, OSM, SLC11A1, 및 EBI3으로 이루어진 군으로부터 선택되며, 상기 상향조절이 검출된다면, 상기 MALT1 억제제는 상기 대상체에서 상기 MALT1-매개 질병을 치료하는 데 효능이 있는 것으로 결정되고/되거나, 상기 대상체는 상기 MALT1 억제제에 의한 치료에 반응하는 것으로 결정되는, 방법, 또는 상기 사용을 위한 MALT1 억제제.

25. 실시 형태 24에 있어서, 상기 MALT1-매개 질병은 CLL이고, 상기 MALT1 조절되는 유전자는 표 2에서의 것들로 이루어진 군, 바람직하게는 PLAU, IL6, CXCL5, C3, CXCL3, IL8 및 DUSP4로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법, 또는 상기 사용을 위한 MALT1 억제제.

26. 실시 형태 24에 있어서, 상기 MALT1-매개 질병은 NHL이고, 상기 MALT1 조절되는 유전자는 표 4에서의 것들로 이루어진 군, 바람직하게는 IL6, PLAU, IL24, CD22, IL8, PTGS2, CXCR4, IL10, PLAUR, VEGFA, IL12B, OSM, SLC11A1 및 EBI3으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법, 또는 상기 사용을 위한 MALT1 억제제.

27. 실시 형태 18 내지 실시 형태 23 중 어느 하나에 있어서, 상기 MALT1 조절되는 유전자는 표 1 및 표 3에서

의 것들로 이루어진 군, 바람직하게는 CXCL10, CXCL9, IL2, CCL8, FN1, MSR1, EGR2, IL21, TNFSF10, APOE, CXCL11, CMKLR1, CCL13, CXCL6, XCL2, SPP1, CD163, FCGR1A, SERPING1, 및 TNF로 이루어진 군으로부터 선택되며, 상기 억제가 검출된다면, 상기 MALT1 억제제는 상기 대상체에서 상기 MALT1-매개 질병을 치료하는 데 효능이 있는 것으로 결정되고/되거나, 상기 대상체는 상기 MALT1 억제제에 의한 치료에 반응하는 것으로 결정되는, 방법, 또는 상기 사용을 위한 MALT1 억제제.

28. 실시 형태 27에 있어서, 상기 MALT1-매개 질병은 CLL이고, 상기 MALT1 조절되는 유전자는 표 1에서의 것들로 이루어진 군, 바람직하게는 CXCL10, FN1, CXCL9, CXCL11, IL2, CCL8, CMKLR1, MSR1, EGR2 및 CCL13으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법, 또는 상기 사용을 위한 MALT1 억제제.

29. 실시 형태 27에 있어서, 상기 MALT1-매개 질병은 NHL이고, 상기 MALT1 조절되는 유전자는 표 3에서의 것들로 이루어진 군, 바람직하게는 CXCL10, FN1, CXCL9, CCL8, MSR1, CXCL6, IL2, XCL2, SPP1, CD163, FCGR1A, SERPING1, APOE 및 TNF로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법, 또는 상기 사용을 위한 MALT1 억제제.

30. 실시 형태 18 내지 실시 형태 29 중 어느 하나에 있어서, 상기 자극된 샘플, 비자극된 샘플, 자극된 대조 샘플 또는 비자극된 대조 샘플에서의 상기 MALT1 조절되는 유전자의 발현 수준은,

1) 상기 자극된 샘플, 비자극된 샘플, 자극된 대조 샘플 또는 비자극된 대조 샘플에서 세포로부터 RNA를 추출하는 단계; 및

2) 상기 추출된 RNA로부터 상기 MALT1 조절되는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 방법에 의해 측정되는, 방법, 또는 상기 사용을 위한 MALT1 억제제.

31. 실시 형태 18 내지 실시 형태 29 중 어느 하나에 있어서, 상기 자극된 샘플, 비자극된 샘플, 자극된 대조 샘플 또는 비자극된 대조 샘플의 단리된 PBMC에서의 상기 MALT1 조절되는 유전자의 발현 수준은,

1) 상기 자극된 샘플, 비자극된 샘플, 자극된 대조 샘플 또는 비자극된 대조 샘플로부터 PBMC를 단리하는 단계;

2) 상기 단리된 PBMC로부터 RNA를 추출하는 단계; 및

3) 상기 추출된 RNA로부터 상기 MALT1 조절되는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 방법에 의해 측정되는, 방법, 또는 상기 사용을 위한 MALT1 억제제.

32. 실시 형태 1 내지 실시 형태 31 중 어느 하나에 있어서, 상기 자극된 PBMC는 T 세포, B 세포, 자연 살해 세포, 단핵구, 또는 수지상 세포인, 방법, 또는 상기 사용을 위한 MALT1 억제제.

33. 실시 형태 18 내지 실시 형태 29 중 어느 하나에 있어서, 상기 MALT1-매개 질병은 림프종, 예컨대 비호지킨 림프종(NHL), 바람직하게는 미만성 거대 B-세포 림프종(DLBCL), 더 바람직하게는 DLBCL의 활성화된 B-세포-유사(ABC) 아형이거나, 또는 상기 MALT1-매개 질병은 백혈병, 바람직하게는 만성 림프구성 백혈병(CLL)인, 방법, 또는 상기 사용을 위한 MALT1 억제제.

34. MALT1-매개 질병의 치료를 필요로 하는 대상체에서 MALT1 억제제의 약력학적 효과를 평가하는 방법으로서,

a) 상기 대상체의 제1 혈액 샘플로부터 PBMC를 단리하는 단계로서, 상기 MALT1 억제제는 상기 대상체에게 또는 상기 대상체의 제1 혈액 샘플에 투여되었던, 상기 단계;

b) 상기 제1 혈액 샘플로부터 단리된 PBMC에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 제1 수준을 측정하는 단계;

c) 상기 제1 수준을 상기 대상체의 제2 혈액 샘플로부터 단리된 PBMC에서 상기 MALT1 조절되는 유전자 발현의 제2 수준과 비교하는 단계로서, 상기 MALT1 억제제는 생체내 또는 시험관내 중 어느 하나에서도 상기 제2 혈액 샘플에 투여되지 않았으며, 상기 제1 혈액 샘플로부터 단리된 PBMC는 상기 제2 혈액 샘플로부터 단리된 PBMC와 동일한 세포 유형을 갖는, 상기 단계를 포함하며,

여기서, 상기 제1 수준이 상기 제2 수준보다 낮거나 높다면, 상기 MALT1 억제제는 상기 대상체에서 상기 MALT1-매개 질병을 치료하는 데 효능이 있는 것으로 결정되거나, 또는 상기 대상체는 상기 MALT1 억제제에 의한 치료에 반응하는 것으로 결정되는, 방법.

35. 인간 대상체에서 MALT1-매개 질병을 생체내에서 치료 및/또는 진단하는 방법에 사용하기 위한 MALT1 억제제로서,

상기 MALT1 억제제는 상기 대상체에서 효능이 있는 것으로 결정되거나, 또는 상기 대상체는 상기 MALT1 억제제

에 반응할 것으로 결정되며, 상기 결정은

a) 상기 대상체의 제1 혈액 샘플로부터 PBMC를 단리하는 단계로서, 상기 MALT1 억제제는 상기 대상체에게 또는 상기 대상체의 제1 혈액 샘플에 투여되었던, 상기 단계;

b) 상기 제1 혈액 샘플로부터 단리된 PBMC에서 MALT1 조절되는 유전자 발현의 제1 수준을 측정하는 단계;

c) 상기 제1 수준을 상기 대상체의 제2 혈액 샘플로부터 단리된 PBMC에서 상기 MALT1 조절되는 유전자 발현의 제2 수준과 비교하는 단계로서, 상기 MALT1 억제제는 생체내 또는 시험관내 중 어느 하나에서도 상기 제2 혈액 샘플에 투여되지 않았으며, 상기 제1 혈액 샘플로부터 단리된 PBMC는 상기 제2 혈액 샘플로부터 단리된 PBMC와 동일한 세포 유형을 갖는, 상기 단계를 포함하는 방법에 의해 수행되며,

여기서, 상기 제1 수준이 상기 제2 수준보다 낮거나 높다면, 상기 MALT1 억제제는 상기 대상체에서 상기 MALT1-매개 질병을 치료하는 데 효능이 있는 것으로 결정되거나, 또는 상기 대상체는 상기 MALT1 억제제에 의한 치료에 반응하는 것으로 결정되는, MALT1 억제제.

36. 다른 실시 형태들 중 어느 하나에 있어서, 상기 억제가 검출된다면, 상기 MALT1 억제제는 상기 대상체에서 상기 MALT1-매개 질병을 치료하는 데 효능이 있는 것으로 결정되거나, 또는 상기 대상체는 상기 MALT1 억제제에 의한 치료에 반응하는 것으로 결정되는, 방법, 또는 상기 사용을 위한 MALT1 억제제.

37. MALT1-매개 질병의 치료를 필요로 하는 인간 대상체에서 MALT1 억제제의 약력학적 효과를 평가하기 위한 키트 또는 병용물로서,

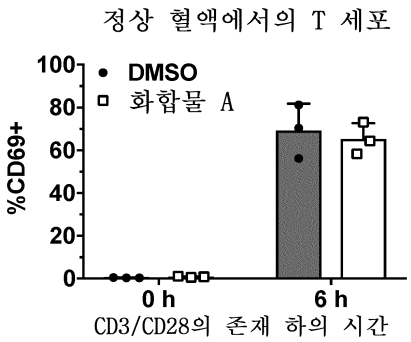
(1) 혈액 샘플 내의 PBMC를 자극하기 위한 하나 이상의 자극제;

(2) 하나 이상의 MALT1 조절되는 유전자, 바람직하게는 표 1 내지 표 4에서의 것들로부터 선택되는, 더 바람직하게는 PLAU, IL6, C3, IL8, VEGFA, CXCL5, CXCL3, DUSP4, IL24, CD22, PTGS2, CXCR4, IL10, PLAUR, IL12B, OSM, SLC11A1, EBI3, CXCL10, CXCL9, IL2, CCL8, FN1, MSR1, EGR2, IL21, TNFSF10, APOE, CXCL11, CMKLR1, CCL13, CXCL6, XCL2, SPP1, CD163, FCGR1A, SERPING1, TN, NF-κB2, TNFSF10, APOE, 및 PYCARD로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자에 상보적인 올리고뉴클레오티드 및/또는 프라이머를 포함하며, 상기 올리고뉴클레오티드 및/또는 프라이머는 선택적으로 표지되는, 키트 또는 병용물.

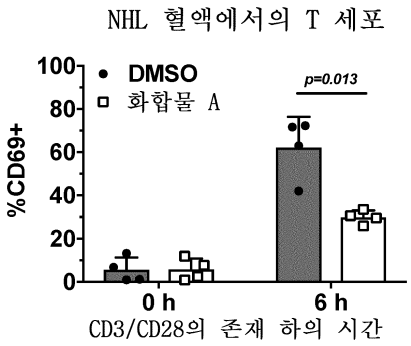
38. 실시 형태 37에 있어서, 상기 하나 이상의 자극제는 상기 혈액 샘플 내의 T 세포를 자극하기 위한 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 상기 혈액 샘플 내의 T 세포를 자극하기 위한 항-IgM 항체 또는 이의 항원-결합 단편 중 적어도 하나를 포함하는, 키트.

도면

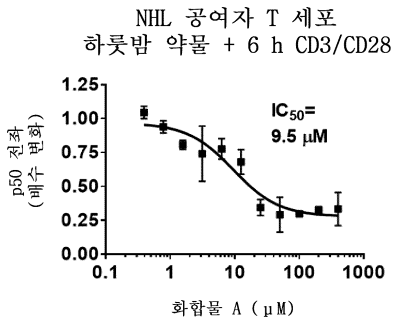
도면1a



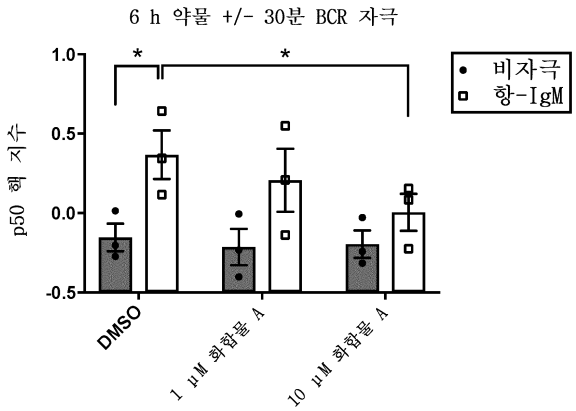
도면1b


NHL 혈액에서의 T 세포
DMSO
화합물 A
p=0.013
%CD69+
100
80
60
40
20
0
0 h
6 h
CD3/CD28의 존재 하의 시간

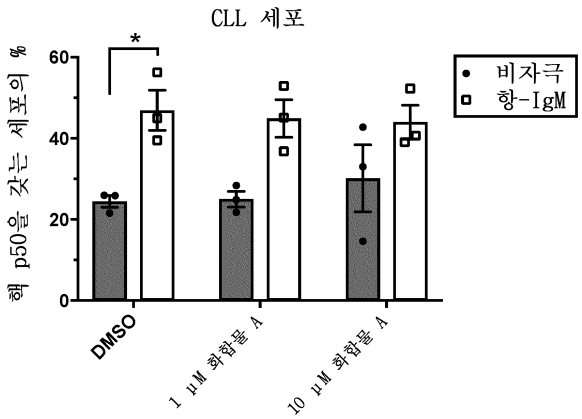
도면2


NHL 공여자 T 세포
하룻밤 약물 + 6 h CD3/CD28
IC50=
9.5 μM
p50 전좌
(배수 변화)
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
0.1
1
10
100
1000
화합물 A (μM)

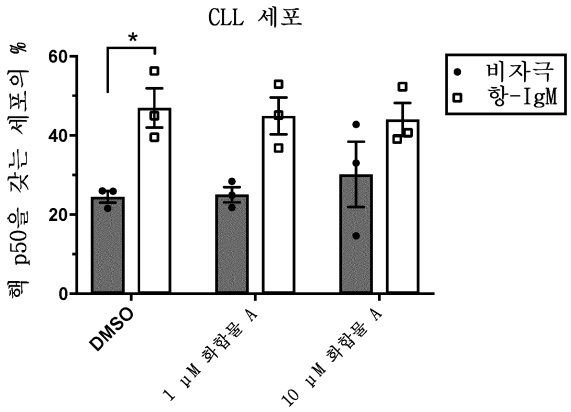
도면3


6 h 약물 +/- 30분 BCR 자극
비자극
항-IgM
p50 핵 지수
1.0
0.5
0.0
-0.5
*
*
DMSO
1 μM 화합물 A
10 μM 화합물 A

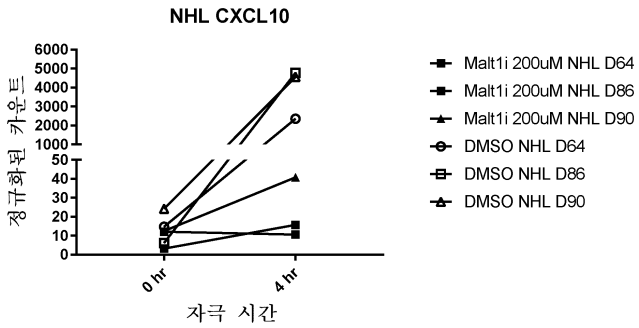
도면4



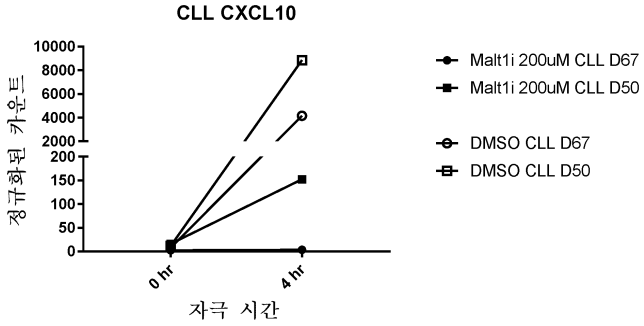
도면5



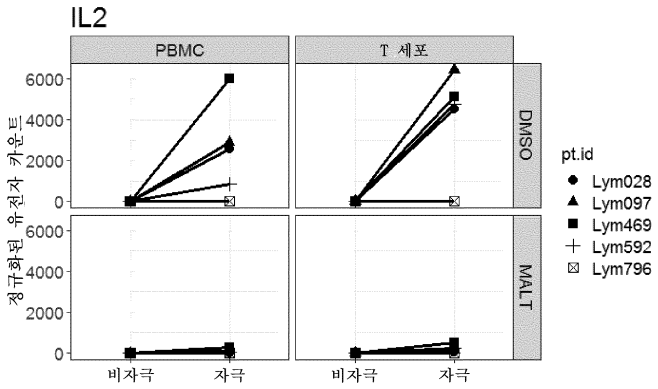
도면6a



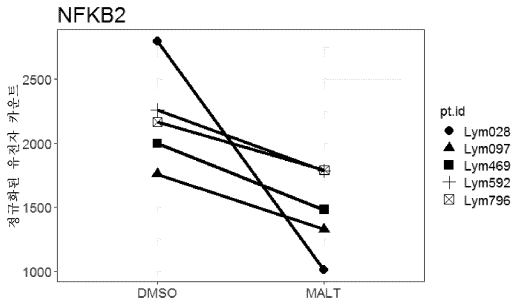
도면6b



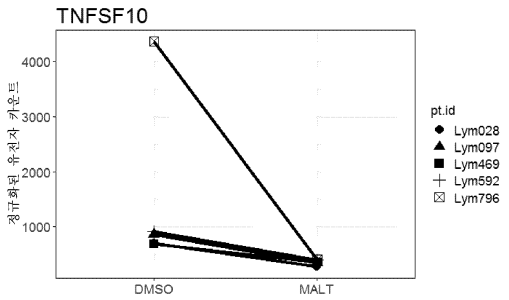
도면7



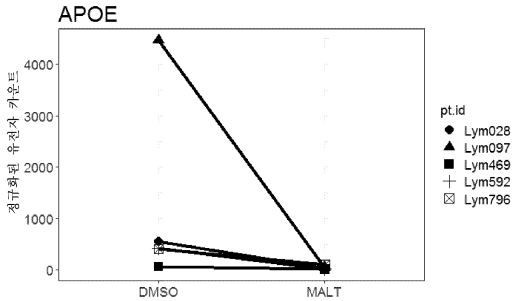
도면8a



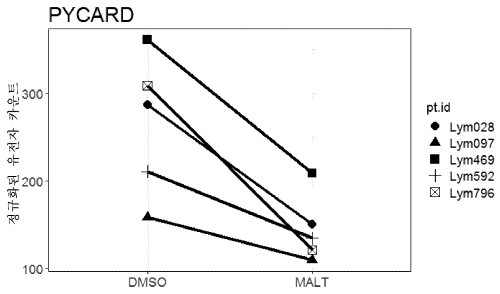
도면8b



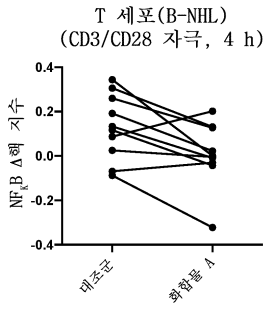
도면8c



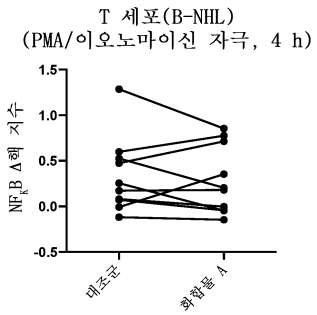
도면8d



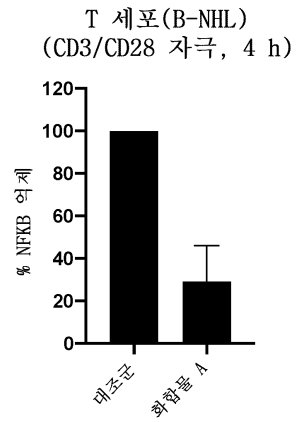
도면9a



도면9b



도면9c



도면9d

