



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년08월18일
(11) 등록번호 10-2144452
(24) 등록일자 2020년08월07일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2014-7019549
- (22) 출원일자(국제) 2012년12월14일
심사청구일자 2017년12월14일
- (85) 번역문제출일자 2014년07월14일
- (65) 공개번호 10-2014-0128299
- (43) 공개일자 2014년11월05일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2012/069767
- (87) 국제공개번호 WO 2013/090732
국제공개일자 2013년06월20일
- (30) 우선권주장
61/570,366 2011년12월14일 미국(US)
61/652,738 2012년05월29일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
W01998041648 A2*
W02007072219 A2*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
보드 오브 리전츠, 더 유니버시티 오브 텍사스 시스템
미국 텍사스주 78701 오스틴 웨스트 7번 스트리트 210
다나-파머 캔서 인스티튜트 인크.
미국 메사추세츠 02215 보스턴 브룩클린 예비뉴 450
- (72) 발명자
멀러 플로리안 엘.
미국 텍사스주 77030 휴스턴 유닛 1958 홀콤비 블러바드 1515
플레처-사나니코네 엘리엇
미국 텍사스주 77030 휴스턴 유닛 1958 홀콤비 블러바드 1515
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
장훈

전체 청구항 수 : 총 10 항

심사관 : 정의준

(54) 발명의 명칭 암 요법을 위한 병립 유전자 비활성화 생물표식과 표적들

(57) 요약

하우스킵핑 유전자의 이형접합성 비활성화 (또는 기능적 중복 하우스킵핑 유전자의 동형접합성 결실)를 포함하는 암을 가진 것으로 판단되는 대상을 이 유전자의 저해제로 대상을 치료함으로써 상기 대상을 치료하는 방법. 예를 들면, ENO 유전자 결실을 가진 암에 걸린 대상은 당분해 저해제, 가령 에놀라제 저해제로 치료될 수 있다. 일부 측면들에 있어서, ARS 유전자 결실을 가진 암에 걸린 대상은 ARS 저해제로 치료될 수 있다.

(72) 발명자

컬라 시모나

미국 텍사스주 77030 휴스턴 유닛 1958 홀콤비 블러바드 1515

아킬란티 엘리사

미국 텍사스주 77030 휴스턴 유닛 1958 홀콤비 블러바드 1515

디피노 로날드

미국 텍사스주 77030 휴스턴 유닛 194 홀콤비 블러바드 1515

명세서

청구범위

청구항 1

대상체에서 암을 치료하는데 사용하기 위한 조성물로서, 상기 암은 하우스키퍼 유전자(housekeeping gene)에서 동형접합성 결실을 갖고, 상기 하우스키퍼 유전자는 기능적 중복 상동체(redundant homologue)를 가지며, 상기 조성물은 상기 중복 상동체의 활성을 저해하는데 충분한 양의 상기 중복 상동체의 저해제를 포함하며,

(a) 상기 하우스키퍼 유전자는 에놀라제 1 (ENO1)이고 상기 중복 상동체는 에놀라제 2 (ENO2)이거나;

(b) 상기 하우스키퍼 유전자는 니코틴아미드 뉴클레오티드 아데닐일 전이효소 1 (NMNAT1)이고 상기 중복 상동체는 니코틴아미드 뉴클레오티드 아데닐일 전이효소 2 (NMNAT2)이거나;

(c) 상기 하우스키퍼 유전자는 아코니타제 1 (ACO1)이고 상기 중복 상동체는 아코니타제 3(ACO3)이거나;

(d) 상기 하우스키퍼 유전자는 판토테네이트 키나제 1 (PANK1)이고 상기 중복 상동체는 판토테네이트 키나제 3 (PANK3)인, 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 하우스키퍼 유전자는 에놀라제 1 (ENO1)이고 상기 중복 상동체는 에놀라제 2 (ENO2)이거나;

상기 하우스키퍼 유전자는 니코틴아미드 뉴클레오티드 아데닐일 전이효소 1 (NMNAT1)이고 상기 중복 상동체는 니코틴아미드 뉴클레오티드 아데닐일 전이효소 2 (NMNAT2)인, 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 저해제는 상기 중복 상동체의 발현 또는 활성을 저해하는 핵산, 상기 중복 상동체에 특이적으로 결합하는 항체, 또는 상기 중복 상동체의 작은 분자 저해제인, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 화학요법제를 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 화학요법제가 DNA 항상성을 간섭하는, 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, (a) 부분에 대한 저해제가 포스포노아세트히드록사메이트 또는 이의 유도체인, 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, (b) 부분에 대한 저해제가 Np2AD, Np4AD 또는 Nap4AD 또는 이의 유도체인, 조성물.

청구항 8

세포 증식을 손상시키거나, 세포에서 세포 사멸을 유도하거나, 또는 이들 둘다를 위한 시험관내 방법으로서, 상기 세포는 하우스키퍼 유전자에 동형접합성 결실을 갖고, 상기 하우스키퍼 유전자는 기능적 중복 상동체를 가지며, 상기 방법은 상기 세포를 중복 상동체의 활성을 저해하는데 충분한 양의 상기 중복 상동체의 저해제와 접촉 시킴을 포함하고, 여기서

상기 하우스키퍼 유전자는 에놀라제 1 (ENO1)이고 상기 중복 상동체는 에놀라제 2 (ENO2)이거나;

상기 하우스키퍼 유전자는 니코틴아미드 뉴클레오티드 아데닐일 전이효소 1 (NMNAT1)이고 상기 중복 상동체는 니코틴아미드 뉴클레오티드 아데닐일 전이효소 2 (NMNAT2)인, 시험관내 방법.

청구항 9

삭제

청구항 10

대상체로부터 취한 시료에서 하우스키픝 유전자의 대사 경로에서 하나 또는 그 이상의 대사산물 수준을 제1항의 조성물에 의해 치료되는 대상체에서의 치료 레지멘의 유효성의 지표로서 사용하는 시험관내 방법으로서, 상기 방법이 대상체로부터 취한 시료에서 하우스키픝 유전자의 대사 경로에서 하나 또는 그 이상의 대사산물 수준을 측정함을 포함하고, 이때 상기 대사산물의 축적은 상기 치료가 효과적임을 나타내는 것이며,

여기서

- a) 상기 하우스키픝 유전자는 에놀라제 1 (ENO1)이고 중복 상동체는 에놀라제 2 (ENO2)이거나;
- b) 상기 하우스키픝 유전자는 니코틴아미드 뉴클레오티드 아데닐일 전이효소 1 (NMNAT1)이고 중복 상동체는 니코틴아미드 뉴클레오티드 아데닐일 전이효소 2 (NMNAT2)인, 시험관내 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 하우스키픝 유전자는 에놀라제 1이고 상기 대사산물은 글리세레이트인, 시험관내 방법.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 2011년 12월 14일자로 제출된 미국 가특허 출원 번호 61/570,366와 2012년 5월 29일자로 제출된 미국 가특허 출원 번호 61/652,738을 우선권으로 주장하며, 이들의 전문은 명세서의 참고자료에 포함된다.

[0002] 본 발명은 국립 위생 연구소(National Institutes of Health)에서 제공하는 Grant No. P01CA95616에 의해 정부 지원으로 이루어진 것이다. 정부는 본 발명에 대하여 일정 권리를 소유한다.

[0003] 파일명 UTFCP1138WO_ST25.txt으로 포함된 서열 목록은 2012년 12월 14일자로 생성된 크기가 2 KB (Microsoft Windows에서 측정된 크기)이며, 전자적으로 제출되어 본 명세서에 통합된다.

[0004] **1. 본 발명의 분야**

[0005] 본 발명은 분자 생물학 및 종양학 분야에 일반적으로 관계된다. 좀더 구체적으로, 본 발명은 기능적으로 비활성화된(가령, 다른 기전들중에서 이 유전자 코딩 서열의 전부 또는 일부의 결실 또는 돌연변이, 좌위(locus) 부분의 후생적 침묵(epigenic silencing)에 의해) 필수 유전자의 한 개 복사체를 보유하는 암을 식별하고 치료하는 방법에 관계된다.

배경 기술

[0006] **2. 관련 기술의 설명**

[0007] 수년간 암 치료 분야의 급속한 발전에도 불구하고 암 치료는 여전히 성공하기 힘들다. 효과적인 치료에 있어서 한 가지 주요 복합적 요인은 종양 특징화를 위한 통상적인 진단 분석들(가령, 병리학적 검사에 의한)이 임의의 주어진 암을 치료하는데 있어서 어떠한 유형의 항암 요법이 성공적일 수 있는지에 대하여 제한적인 지침을 제공한다. 사실, 암 세포들은 다양한 항암 요법들에 대하여 광범위한 저항성/민감성을 나타내고, 따라서 주어진 요법에 있어서 특정 암이 저항성일지 또는 민감성일지를 예측하는 것은 어렵다. 이 문제를 해결하기 위하여, 환자들의 특이적 암 세포들을 더 특징화시키기 위하여 종양 세포들의 유전적 분석이 최근에 이용되었다. 그러나, 이러한 분석들의 결과는 일반적으로 암에서 과도한 유전자 변화들을 보여주고 치료적 중재에 유용한 지

침을 대개 제공하지 못하였다. 예를 들면, 게놈의 많은 영역들의 이형접합성(heterozygous) 결실은 암에서 원형질성(prototypic) 체세포 사건이다. 많은 경우들에서, 암 세포들에 의해 나타나는 유전자 불안정성은 결정적인 종양 억제자 유전자들의 기능을 제거함으로써 종양이 생성되도록 몰아간다. 그러나, 결실들은 대개 크고, 암 병인에서 알려지지 않은 역할을 가진 이웃 유전자들을 포괄할 수 있다. 종양 세포들에 있어서 이러한 돌연변이들이 암 진단 또는 치료법을 개선시키는데 어떻게 이용될 수 있는지에 대한 지침은 현재까지 없다.

발명의 내용

본 발명의 요약

- [0008] **본 발명의 요약**
- [0009] 본 발명의 구체예들은 일부 암들이 중복(redundant) 하우스키핑 유전자들(housekeeping genes)에 동형접합성(homozygous) 결실들을 보유하고, 그리고 이러한 사실은 결실되지 않은 중복 상동체(homologue)를 표적으로 함으로써, 치료적으로 개발될 수 있다는 발견에 근거한다. 유사하게, 하우스키핑 유전자들 안에 이형접합성 결실들을 포함하는 암들이 하우스키핑 유전자의 결실되지 않은 복사체를 표적으로 하는 치료적 처리에 민감성을 또한 부여받다고 알고 있다. 추가 구체예에서, 두 개(또는 그 이상의) 상기 하우스키핑 유전자들에 이형접합성 결실들을 포함하는 암 세포들이 이형접합성 결실을 포함하는 하우스키핑 유전자들 각각의 결실되지 않은 복사체를 표적으로 하는 치료적 처리에 민감성을 부여받고, 이 처리에 의해 치료될 수 있다고 생각된다.
- [0010] 한 측면에서, 본 발명의 구체예들은 대상의 암을 치료하는 방법들을 제시한다. 이 암은 하우스키핑 유전자에 동형접합성 결실을 보유하고, 이 하우스키핑 유전자는 기능적 중복 상동체를 보유한다. 중복 상동체의 활성을 억제하는데 충분한 양의 중복 상동체의 저해제를 이 세포에 접촉시킴으로써, 이 대상은 치료된다.
- [0011] 또다른 측면에서, 본 발명의 구체예들은 세포 증식을 손상시키고/시키거나 세포 사멸을 유도하는 방법들을 제시한다. 이 세포는 이 세포 하우스키핑 유전자에 동형접합성 결실을 보유하고, 이 하우스키핑 유전자는 기능적 중복 상동체를 보유한다. 중복 상동체의 활성을 억제하는데 충분한 양의 중복 상동체의 저해제를 이 세포에 접촉시킴으로써, 세포 증식 및/또는 세포 사멸이 유도된다.
- [0012] 임의선택적으로, 이 세포에 화학요법제가 더 접촉된다. 일부 구체예들에서 이 화학요법제는 DNA 항상성(homeostasis)을 간섭한다.
- [0013] 이 저해제는 예를 들면, 중복 상동체의 발현 또는 활성을 억제시키는 핵산, 중복 상동체 또는 작은 분자에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있다. 저해제들은 예를 들면 포스포노아세트하이드록사메이트(phosphonoacetohydroxamate), 데히드로에피안드로스테론(dehydroepiandrosterone), Np2AD, Np4AD, Nap4AD, 플루오르시트레이트(fluorocitrate) 또는 호판테네이트(hopantenate) 또는 이의 유도체들을 포함한다.
- [0014] 일부 측면들에 있어서, 상기 하우스키핑 유전자는 엔돌라제 1 (ENO1)이고, 상기 중복 상동체는 엔돌라제 2 (ENO2)이고; 하우스키핑 유전자는 헥소오즈-6-포스페이트 데히드로게나제 (H6PD)이며, 상기 중복 상동체는 글루코오즈-6 데히드로게나제 (G6PD)이고; 하우스키핑 유전자는 키네신(kinesin) 패밀리 구성원 1B (KIF1B)이고, 상기 중복 상동체는 키네신 패밀리 구성원 1A (KIF1A) 또는 키네신 패밀리 구성원 1C (KIF1A)이며; 하우스키핑 유전자는 니코틴아미드 뉴클레오티드 아데닐일 전이효소 1 (NMNAT1)이고, 상기 중복 상동체는 니코틴아미드 뉴클레오티드 아데닐일 전이효소 2 (NMNAT2) 또는 니코틴아미드 뉴클레오티드 아데닐일 전이효소 3 (NMNAT3)이고; 하우스키핑 유전자는 유비퀴틴화(ubiquitination) 인자 E4B (UBE4B)이고, 상기 중복 상동체는 유비퀴틴화 인자 4A (UBE4A)이며; 하우스키핑 유전자는 아코니타제(aconitase) 1 (ACO1)이고, 상기 중복 상동체는 아코니타제 2 (ACO2) 또는 아코니타제 3 (ACO3)이며; 하우스키핑 유전자는 켈히(kelch)-유사 9 (KLHL9)이고, 상기 중복 상동체는 켈히-유사 13 (KLHL13)이며; 하우스키핑 유전자는 판토테네이트 키나제 1 (PANK1)이고, 상기 중복 상동체는 판토테네이트 키나제 3 (PANK3)이며; 또는 하우스키핑 유전자는 키나제 패밀리 구성원 20B (KIF20B)이며, 상기 중복 상동체는 키나제 패밀리 구성원 20A (KIF20A)이다.
- [0015] 대상으로부터 취한 시료에서 하우스키핑 유전자의 대사 경로에서 하나 또는 그 이상의 대사산물 수준을 측정함으로써, 본 발명에 따른 방법에 의해 치료되는 대상에서 치료 레지멘(regimen)의 효과를 평가하는 방법들 또한 본 발명의 구체예들에서 제시된다. 대사산물의 측정은 이 치료가 효과적임을 나타낸다. 예를 들면 하우스키핑 유전자는 에놀라제(enolase)일 경우, 이 대사산물은 글리세레이트다.
- [0016] 다른 명시가 없는 한, 본 명세서에서 이용되는 모든 기술적 그리고 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자들이 통상적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 적합한 방법들과 재료들이 하기에서 설명되지만, 본 명세서에서 설명된 것과 유사한 또는 대등한 방법들과 재료들이 본 발명을 실시하는데 이용될 수

있다. 본 명세서에서 언급된 모든 공개자료, 특허 출원 및 기타 참고자료들은 전문이 명세서의 참고자료에 포함된다. 충돌이 되는 경우, 정의를 포함하는 본 명세서가 우선적이다. 추가로, 본 명세서에서 설명된 재료들, 방법들 및 실시예들은 오로지 설명을 위한 것이며, 이에 제한을 두고자 하는 의도는 없다.

[0017] 추가 구체예에서, 최소한 제 1 당분해(glycolysis) 저해제를 대상에게 투여함으로써 암에 걸린 대상을 치료하는 방법이 제시되는데, 이때 이 암 세포들은 에놀라제 1 (ENO1) 유전자의 한 개 복사체를 비활성화시키는 이형접합성 돌연변이를 포함하는 것으로 판단된다. 따라서, 일부 측면들에 있어서, 암에 걸린 대상을 치료하는 방법이 제시되는데, 이 방법은 (a) ENO1 유전자의 한 개 복사체를 비활성화시키는 이형접합성 돌연변이를 포함하는 암 세포를 포함하는 것으로 결정된 대상을 선별하고; 그리고 (b) 최소한 제 1 당분해 저해제를 대상에게 투여하는 것을 포함한다.

[0018] 추가 구체예에서, 당분해 저해제 요법 (이를 테면, 제 1 당분해 저해제를 이용한 치료법)에 적합한 암에 걸린 대상을 선별하는 방법이 제시되는데, 이 방법은 대상의 암 세포들이 ENO1 유전자의 한 개 복사체를 비활성화시키는 이형접합성 돌연변이를 포함하는지의 판단을 포함하고, 이때 이 암 세포들이 이형접합성 돌연변이를 포함한다면, 그 다음 이 대상은 당분해 저해제 요법에 적합한 것으로 선택된다. 추가 측면에서 당분해 저해제 요법에 적합한 암에 걸린 대상을 선택하는 방법이 제시되는데, 이 방법은 (a) 대상의 암 세포들이 ENO1 유전자의 한 개 복사체를 비활성화시키는 이형접합성 돌연변이를 포함하는지 여부를 결정하고; 그리고 (b) 이 암 세포들이 이형접합성 돌연변이를 포함한다면, 당분해 저해제 요법에 적합한 대상으로 선택되는 것을 포함한다.

[0019] 여전히 추가 구체예에서, 당분해 저해제 요법에 대하여 암에 걸린 대상의 반응을 예측하는 방법이 제시되는데, 이 방법은 대상의 암 세포들이 ENO1 유전자의 한 개 복사체를 비활성화시키는 이형접합성 돌연변이를 포함하는지 여부를 결정하는 것을 포함하고, 이때 이 암 세포들이 이형접합성 돌연변이를 포함한다면, 그 다음 이 대상은 당분해 저해제 요법에 대하여 우호적인 반응을 할 것으로 예상된다. 추가 측면에서, 당분해 저해제 요법에 대한 암에 걸린 대상의 반응을 예측하는 방법이 있는데, 이 방법은 (a) 대상의 암 세포들이 ENO1 유전자의 한 개 복사체를 비활성화시키는 이형접합성 돌연변이를 포함하는지 여부를 결정하고; 그리고 (b) 대상의 암 세포들이 이형접합성 돌연변이를 포함한다면, 이 대상은 당분해 저해제 요법에 대하여 우호적인 반응을 할 것으로 예상되는 대상으로 식별되거나; 또는 대상의 암 세포들이 이형접합성 돌연변이를 포함하지 않는다면, 이 대상은 당분해 저해제 요법에 우호적인 반응을 할 것으로 예상되지 않은 대상으로 식별되는 것을 포함한다.

[0020] 여전히 추가 구체예에서 암에 걸린 대상을 치료하는 방법이 제시되는데, 이 방법은 최소한 t-RNA 합성효소 (ARS) 저해제를 대상에게 투여하는 것을 포함하고, 이때 이 암 세포들은 ARS 유전자의 한 개 복사체를 비활성화시키는 이형접합성 돌연변이를 포함하는 것으로 결정된다. 따라서, 일부 측면들에 있어서, 암에 걸린 대상을 치료하는 방법이 제시되는데, 이 방법은 (a) ARS 유전자의 한 개 복사체를 비활성화시키는 이형접합성 돌연변이를 포함하는 것으로 결정된 대상을 선별하고; 그리고 (b) 최소한 제 1 ARS 저해제를 이 대상에게 투여하는 것을 포함한다.

[0021] 추가 구체예에서, ARS 저해제 요법에 적합한 암에 걸린 대상을 선별하는 방법이 제시되는데 (이를 테면, 제 1 ARS 저해제를 이용한 치료법), 이 방법은 이 대상의 암 세포들이 ARS 유전자의 한 개 복사체를 비활성화시키는 이형접합성 돌연변이의 포함여부 판단을 포함하고, 이때 이 암 세포들이 이형접합성 돌연변이를 포함한다면, 그 다음 이 대상은 ARS 저해제 요법에 적합한 것으로 선택된다. 추가 측면에서 ARS 저해제 요법에 적합한 암에 걸린 대상을 선별하는 방법이 제시되는데, 이 방법은 (a) 이 대상의 암 세포들이 ARS 유전자(또는 두 개 또는 그 이상의 ARS 유전자) 부분의 한 개 복사체를 비활성화시키는 이형접합성 돌연변이를 포함하는지 여부를 결정하고; 그리고 (b) 이 대상의 암 세포들이 이형접합성 돌연변이를 포함하는 경우, ARS 저해제 요법에 적합한 대상을 선별하는 것을 포함한다.

[0022] 여전히 추가 구체예에서, ARS 저해제 요법에 대한 암에 걸린 대상의 반응을 예측하는 방법이 제시되는데, 이 방법은 이 대상의 암 세포들이 ARS 유전자의 한 개 복사체를 비활성화시키는 이형접합성 돌연변이를 포함하는지 여부를 결정하는 것을 포함하고, 이때 이 암 세포들이 이형접합성 돌연변이를 포함한다면, 이 대상은 ARS 저해제 요법에 대하여 우호적인 반응을 가질 것으로 예상된다. 추가 측면에서, ARS 저해제 요법에 대한 암에 걸린 대상의 반응을 예측하는 방법이 제시되는데, 이 방법은 (a) 이 대상의 암 세포들이 ARS 유전자의 한 개 복사체를 비활성화시키는 이형접합성 돌연변이를 포함하는지 여부를 결정하고; 그리고 (b) 대상의 암 세포들이 이형접합성 돌연변이를 포함한다면, 이 대상은 ARS 저해제 요법에 대하여 우호적인 반응을 가질 것으로 예상되는 대상으로 식별되며; 또는 대상의 암 세포들이 이형접합성 돌연변이를 포함하지 않는다면, 이 대상은 ARS 저해제 요법에 대하여 우호적인 반응을 가질 것으로 예상되지 않은 대상으로 식별되는 것을 포함한다.

- [0023] 추가 구체예에서 암에 걸린 대상을 치료하는 방법이 제시되는데, 이 방법은 최소한 제 1 포스포글루코네이트 데히드로게나제 저해제를 이 대상에게 투여하는 것을 포함하고, 이때 이 암 세포들은 포스포글루코네이트 데히드로게나제 (PGD) 유전자의 한 개 복사체를 비활성화시키는 이형접합성 돌연변이를 포함하는 것으로 판단된다. 따라서, 일부 측면들에 있어서, 암에 걸린 대상을 치료하는 방법이 제시되는데, 이 방법은 (a) PGD 유전자의 한 개 복사체를 비활성화시키는 이형접합성 돌연변이를 포함하는 것으로 판단되는 대상을 선별하고; 그리고 (b) 최소한 제 1 포스포글루코네이트 데히드로게나제 저해제 (가령, 6-아미노니코틴아미드)를 이 대상에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0024] 추가 구체예에서, 포스포글루코네이트 데히드로게나제 저해제 요법 (이를 테면, 제 1 포스포글루코네이트 데히드로게나제 저해제를 이용한 치료법)에 적합한 암에 걸린 대상을 선별하는 방법이 제시되는데, 이 방법은 이 대상의 암 세포들이 PGD 유전자의 한 개 복사체를 비활성화시키는 이형접합성 돌연변이를 포함여부의 판단을 포함하고, 이때 이 암 세포들이 이형접합성 돌연변이를 포함한다면, 그 다음 이 대상은 포스포글루코네이트 데히드로게나제 저해제 요법에 적합한 것으로 선택된다. 추가 측면에서, 포스포글루코네이트 데히드로게나제 저해제 요법에 적합한 암에 걸린 대상을 선별하는 방법이 제시되는데, 이 방법은 (a) 이 대상의 암 세포들이 PGD 유전자의 한 개 복사체를 비활성화시키는 이형접합성 돌연변이를 포함하는지 여부를 결정하고; 그리고 (b) 이 대상의 암 세포들이 이형접합성 돌연변이를 포함하는 경우, 포스포글루코네이트 데히드로게나제 저해제 요법에 적합한 대상으로 선택되는 것을 포함한다.
- [0025] 여전히 추가 구체예에서, 포스포글루코네이트 데히드로게나제 저해제 요법에 대한 암에 걸린 대상의 반응을 예측하는 방법이 제시되는데, 이 방법은 이 대상의 암 세포들이 PGD 유전자의 한 개 복사체를 비활성화시키는 이형접합성 돌연변이를 포함하는지 여부를 결정하고, 이때 이 암 세포들이 이형접합성 돌연변이를 포함한다면, 그 다음 이 대상은 포스포글루코네이트 데히드로게나제 저해제 요법에 대하여 우호적인 반응을 보여주는 것으로 예상된다. 추가 측면에서, 포스포글루코네이트 데히드로게나제 저해제 요법에 대한 암에 걸린 대상의 반응을 예측하는 방법이 제시되는데, 이 방법은 (a) 이 대상의 암 세포들이 PGD 유전자의 한 개 복사체를 비활성화시키는 이형접합성 돌연변이를 포함하는지 여부를 결정하는 것을 포함하고; 그리고 (b) 대상의 암 세포들이 이형접합성 돌연변이를 포함한다면, 이 대상은 포스포글루코네이트 데히드로게나제 저해제 요법에 대하여 우호적인 반응을 보여주는 것으로 예상되는 대상으로 식별되며; 또는 대상의 암 세포들이 이형접합성 돌연변이를 포함하지 않는다면, 포스포글루코네이트 데히드로게나제 저해제 요법에 대하여 우호적인 반응을 보이지 않는 것으로 예상되는 대상으로 식별된다.
- [0026] 추가 구체예에서 암에 걸린 대상을 치료하는 방법이 제시되는데, 이 방법은 최소한 제 1 당분해 저해제를 이 대상에게 투여하는 것을 포함하고, 이때 이 암 세포들은 GAPDH, ENO2 및/또는 TPI 유전자들(각각 12p13에 위치됨) 부분의 한 개 복사체를 비활성화시키는 이형접합성 돌연변이를 포함하는 것으로 판단된다. 따라서, 일부 측면들에 있어서, 암에 걸린 대상을 치료하는 방법이 제시되는데, 이 방법은 (a) GAPDH, ENO2 및/또는 TPI 유전자들의 한 개 복사체를 비활성화시키는 이형접합성 돌연변이를 가지는 암 세포들을 포함하는 것으로 판단되는 대상을 선별하고; 그리고 (b) 최소한 제 1 당분해 저해제를 이 대상에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0027] 추가 구체예에서, 당분해 저해제 요법 (이를 테면, 제 1 당분해 저해제를 이용한 치료법)에 적합한 암에 걸린 대상을 선별하는 방법이 제시되는데, 이 방법은 이 대상의 암 세포들이 GAPDH, ENO2 및/또는 TPI 유전자들의 한 개 복사체를 비활성화시키는 이형접합성 돌연변이를 포함하는지 여부를 결정하는 것을 포함하고, 이때 이 암 세포들이 이형접합성 돌연변이를 포함한다면, 이 대상은 당분해 저해제 요법에 적합한 것으로 선택된다. 추가 측면에서, 당분해 저해제 요법에 적합한 암에 걸린 대상을 선별하는 방법이 제시되는데, 이 방법은 (a) 이 대상의 암 세포들이 GAPDH, ENO2 및/또는 TPI 유전자들의 한 개 복사체를 비활성화시키는 이형접합성 돌연변이를 포함하는지 여부를 결정하는 것을 포함하고; 그리고 (b) 이 암 세포들이 이형접합성 돌연변이를 포함한다면, 당분해 저해제 요법을 위한 대상으로 선택된다.
- [0028] 여전히 추가 구체예에서, 당분해 저해제 요법에 대한 암에 걸린 대상의 반응을 예측하는 방법은 이 대상의 암 세포들이 GAPDH, ENO2 및/또는 TPI 유전자들이 한 개 복사체를 비활성화시키는 이형접합성 돌연변이를 포함하는지를 결정하는 것을 포함하고, 이때 이 암 세포들이 이형접합성 돌연변이를 포함한다면, 그 다음 이 대상은 당분해 저해제 요법에 대하여 우호적인 반응을 할 것으로 예상된다. 추가 측면에서, 당분해 저해제 요법에 대한 암에 걸린 대상의 반응을 예측하는 방법은 (a) 이 대상의 암 세포들이 GAPDH, ENO2 및/또는 TPI 유전자들이 한 개 복사체를 비활성화시키는 이형접합성 돌연변이를 포함하는지 여부를 결정하고; 그리고 (b) 이 대상의 암 세포들이 이형접합성 돌연변이를 포함한다면, 이 대상은 당분해 저해제 요법에 대하여 우호적인 반응을 할 것으로 예상되는 대상으로 식별되거나; 또는 이 대상의 암 세포들이 이형접합성 돌연변이중 하나를 포함하지 않는다면,

이 대상은 당분해 저해제 요법에 대하여 우호적인 반응을 할 것으로 예상되지 않은 대상으로 식별되는 것을 포함한다.

[0029] 구체예들의 특정 측면들은 필수 유전자의 한 개 복사체, 이를 테면, ENO1, ARS 유전자, PGD 유전자, GAPDH 유전자, ENO2 유전자 및/또는 TPI 유전자의 한 개 복사체를 비활성화시키는 이형접합성 돌연변이를 포함하는 암에 관계된다. 본 명세서에서 이용된 것과 같이, 이형접합성 돌연변이는 유전자의 두 개 복사체중 오직 하나에서의 돌연변이를 말한다 (이배체 세포에서 또는 삼배체 세포에서 하나의 상실, 또는 좀더 광범위하게, 다배체 세포에서 하나를 제외하고 모두 상실된).

[0030] 예를 들면, 이형접합성 돌연변이는 ENO1의 한 개 복사체를 기능적으로 비활성화시키는 결실, 치환, 전도 (inversion), 재배열 또는 삽입일 수 있다. 일부 측면들에 있어서, 이 돌연변이는 염색체 1p36에서 이형접합성 (heterozygosity) 부분의 상실과 같은 결실이다. 따라서, 특정 측면들에 있어서, 상기 이형접합성 결실은 ENO1 유전자 이상을 포괄할 수 있는데, 이를 테면 ENO1 뿐만 아니라 RERE, CA6 및/또는 SLC2A7를 비활성화시키는 결실일 수 있다. 예를 들면, 일부 측면들에 있어서, 구체예들의 방법은 ENO1의 5' 및 3' 의 결실을 결정하고, 이로 인하여 ENO1가 간접적으로 비활성화되는(결실된) 것과 관련될 수 있다. ENO1의 5' 에 위치하는 유전자들의 예로는 NPHP4, KCNAB2, CHD5, RPL22, RNF207, C1orf211, GPR153, ICMT, HES3, ACOT7, TNFRSF25, PLEKHG5, DNAJC11, HES2, ESPN, MIR4252, NOL9, TAS1R1, ZBTB48, KLHL21, PHF13, THAP3, CAMTA1, VAMP3, PER3, UTS2, TNFRSF9, TRNA_Pseudo, PARK7, AX747125, ERFF11, SLC45A1, RERE와 BC113958을 포함하나 이에 한정되지 않는다. ENO1의 3' 에 위치하는 유전자들의 예로는 CA6, SLC2A7, SLC2A5, GPR157, mir-34, MIR34A, H6PD, SPSB1, 5S rRNA, SLC25A33, TMEM201, PIK3CD, C1orf200, BC038541, CLSTN1, CTNBP1, LZIC, MNAT1, RBP7, UBE4B, KIF1B, APITD1-CORT, PEX14, CASZ1, Mir_584, PGD, APITD1, CORT, DFFA, C1orf127, TARDBP, MASP2, SRM, MTOR, ANGPTL7, EXOSC10, UBIAD1, PTCHD2, FBXO2, FBXO44, FBXO6, MAD2L2, C1orf187, AK125437, AGTRAP, C1orf167, MTHFR, CLCN6, NPPA-AS1, NPPA, NPPB, KIAA2013, PLOD1 및 MFN2을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 특정 측면들에 있어서, 상기 암은 이형접합성 돌연변이를 포함하며, 이때 염색체 1의 전체 암(arm)은 상실된다. 특정 경우들에 있어서, ENO1의 이형접합성 결실은 세포유전적 염색체 스프레드(spreads) 또는 ENO1 유전자의 상류 및 하류 랜덤 DNA 단편들의 복사체 수 분석에 의해 판단될 수 있다.

[0031] 일부 측면들에 있어서, 상기 이형접합성 돌연변이는 GAPDH, ENO2 및/또는 TPI 유전자들의 한 개 복사체를 기능적으로 비활성화시키는 결실, 치환, 전도, 재배열 또는 삽입일 수 있다. 일부 측면들에 있어서, 이 돌연변이는 결실이며, 이를 테면 염색체 12p13에서 이형접합성의 상실이다. 따라서, 특정 측면들에 있어서, 상기 이형접합성 결실은 GAPDH, ENO2 및/또는 TPI 유전자들 이상을 포괄할 수 있는데, 가령, 이 유전자들의 두 개 또는 세 개 모두를 비활성화시키는 결실이 된다.

[0032] 추가 실시예에서, 이형접합성 돌연변이는 ARS 유전자의 한 개 복사체, 이를 테면, EPARS (aka EPRS), VARS, IARS, CARS, SARS, YARS, AARS, KARS, LARS, HARS, RARS 또는 TARS 유전자의 한 개 복사체를 기능적으로 비활성화시키는 결실, 치환, 전도, 재배열 또는 삽입일 수 있다. 일부 측면들에 있어서, 이 돌연변이는 결실, 이를 테면 이 유전자를 포함하는 염색체 좌위에서 이형접합성의 상실이다. 예를 들면, 암 세포는 5q13, 1q41, 6p21, 9q24, 11p15, 1p13, 1p35, 16q13, 16q24, 5q31, 5q32 또는 5q35에서 이형접합성의 상실을 포함할 수 있다. 따라서, 특정 측면들에 있어서, 상기 이형접합성 결실은 하나 이상의 ARS 유전자를 포괄할 수 있는데 이를 테면, SARS 뿐만 아니라 YARS; AARS와 KARS; LARS와 HARS 또는 LARS HARS와 RARS를 비활성화시키는 결실을 포괄한다.

[0033] 여전히 추가 실시예에서, 이형접합성 돌연변이는 PGD 유전자의 한 개 복사체를 기능적으로 비활성화시키는 결실, 치환, 전도, 재배열 또는 삽입일 수 있다. 일부 측면들에 있어서, 이 돌연변이는 결실, 이를 테면, 이 유전자를 포함하는 좌위, 가령, 1p36.22를 포함하는 좌위에서 이형접합성의 상실이다. 특정 측면들에 있어서, 상기 결실은 이 염색체 1p의 추가 부분들을 포괄할 수 있다. 예를 들면, 암 세포는 ENO1과 PGD를 포함하는 결실을 포함할 수 있다. 따라서, 일부 측면들에 있어서, ENO1과 PGD 모두의 비활성화된 한 개 복사체를 포함하는 것으로 식별된 암은 PGD 저해제, 가령 6-아미노니코틴아미드와 병용하여 최소한 제 1 당분해 저해제로 치료될 수 있다.

[0034] 구체예들의 일부 측면들은 최소한 제 1 당분해 저해제를 대상 (가령, ENO1 유전자의 한 개 복사체에 돌연변이를 보유하는 대상)에게 투여하는 것과 관련된다. 당분해 저해제들의 예로는 피루베이트 키나제 (가령, PKLR1 또는 PKM2), 에놀라제 (가령, ENO1, ENO2 또는 ENO3), 포스포글리세레이트 무타제 (가령, PGM1, PGM2, PGM2L1, PGM3 또는 PGM5), 포스포글리세레이트 키나제 (가령, PGK1 또는 PGK2), 글리세르알데히드 포스페이트 데히드로게나제 (GAPDH), 트리오스포페이트 이소메라제 (TPI), 푸락토즈 바이포스페이트 알도라제 (가령, Aldoa, Aldob 또는

Aldoc), 포스포푸락토키나제 (PFKL, PFKM 또는 PFKP), 포스포글루코오스 이소메라제 (GPI) 그리고 헥소키나제 (가령, HK1, HK2 또는 HK3) 부분의 저해제들을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 추가 측면들에 있어서, 이 저해제는 미토콘드리아 전자 운반 연쇄의 저해제다. 일부 측면들에 있어서, 상기 당분해 저해제는 저해성 폴리뉴클레오티드 (가령, siRNA, shRNA 또는 miRNA) 가령, 피루베이트 키나제, 에놀라제 (가령, ENO1), 포스포글리세레이트 무타제, 포스포글리세레이트 키나제, 글리세르알데히드 포스페이트 데히드로게나제, 트리오스포페이트 이소메라제, 푸락토스 바이포스페이트 알도라제, 포스포푸락토키나제, 포스포글루코오스 이소메라제와 헥소키나제를 인코딩하는 유전자의 전부 또는 일부에 상보적인 저해성 폴리뉴클레오티드다. 여전히 추가 측면들에 있어서, 상기 당분해 저해제는 작은 분자 저해제 또는 이의 프로드럭이다. 구체예들에 따른 사용에 적합한 당분해 저해제들의 예로는 2-데옥시글루코오스, 6-아미노니코틴아미드, 테트로즈 디포스페이트, 코닝산(koningic acid)과 MJE3을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0035] 특정 바람직한 측면들에 있어서, 치료제로 사용에 적합한 당분해 저해제는 이 암에서 식별된 이형접합성 유전자 비활성화에 근거하여 선택된다. 예를 들면, 이 암 세포가 ENO1의 이형접합성 비활성화를 포함한다면, 당분해 저해제 요법은 에놀라제 저해제를 포함할 수 있다. 유사하게, GAPDH, ENO2 또는 TPI 유전자의 이형접합성 비활성화를 보유하는 암의 경우에서, 당분해 저해제 요법은 각각 GAPDH, 에놀라제 또는 TPI 저해제를 포함할 수 있다. 특정 측면들에 있어서, 암 세포는 당분해 경로에서 두 개의 유전자들 부분의 이형접합성 비활성화를 포함하고, 당분해 저해제 요법은 이형접합성 결실에 대상 유전자들의 각 저해제를 포함한다.

[0036] 일부 바람직한 측면들에 있어서, 구체예들에 따른 사용에 적합한 당분해 저해제는 에놀라제 저해제, 가령 에놀라제 1 저해제이다. 예를 들면, 에놀라제 1 저해제는 저해성 폴리뉴클레오티드, 가령, ENO1 유전자의 전부 또는 일부에 상보적인 (가령, 에놀라제 1 코딩 mRNA의 전부 또는 일부에 상보적인, 예컨대, NCBI 수탁 번호. NM_001201483.1 또는 NM_001428.3을 참고하라) siRNA, shRNA 또는 miRNA일 수 있다. 여전히 추가 측면들에 있어서, 상기 에놀라제 저해제는 작은 분자 에놀라제 저해제 또는 이의 프로드럭이다. 작은 분자 에놀라제 저해제들의 예로는 D-타르트로네이트 세미알데히드 포스페이트; 3-아미노에놀피루베이트-2-포스페이트; 포스포노아세토히드록사메이트 (PhAH); 2-플루오르-2-포스포노아세토히드록사메이트; (3-히드록시-2-니트로프로필) 포스포네이트; (니트로에틸)포스포네이트; d-(포스포노에틸)니트로레이트; 플로오르화물 그리고 전술한 것들중 임의의 것의 프로드럭들을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0037] 구체예들에 따른 사용에 적합한 ARS 저해제들의 예로는 보렐리딘(Borrelidin) 또는 이의 프로드럭들을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 여전히 추가 측면들에 있어서 ARS 저해제는 헤브리푸긴(febrifugine) 유도체, 가령 할로푸기논(halofuginone) (가령, Sundrud 외, 2009 및 Keller 외, 2012 참고, 명세서의 참고자료에 포함된다)이다. 일부 측면들에 있어서, ARS 저해제는 항-미생물 ARS 저해제다. 여전히 추가 측면들에 있어서 ARS 저해제는 저해성 폴리뉴클레오티드, 가령 ARS 유전자의 전부 또는 일부에 상보적인 siRNA, shRNA 또는 miRNA다. 특정 측면들에 있어서, ARS 저해제는 단백질 합성의 추가 저해제 또는 아미노산 결핍(starvation) 반응의 활성물질과 병용하여 투여된다.

[0038] 구체예들에 따른 사용에 적합한 PGD 저해제들의 예로는 예를 들면, 6-아미노니코틴아미드 또는 이의 프로드럭들을 포함한다. 일부 측면들에 있어서, PGD 저해제는 저해성 폴리뉴클레오티드, 가령 PGD 유전자(가령, NCBI 수탁 번호 NM_002631.2를 참고하라) 부분의 전부 또는 일부에 상보적인 siRNA, shRNA 또는 miRNA일 수 있다.

[0039] 구체예들에 따라 투여에 적합한 표적이 된 저해제들 요법들 (가령, 당분해 PGD 또는 ARS 저해제들)은 약학적으로 수용가능한 운반체 안에 일반적으로 제형화된다. 이러한 요법은 예를 들면, 정맥내, 피내, 동맥내, 복막내, 병소내, 두개내(intracranially), 관절내, 전립선내, 늑막내, 도관내, 비강내, 유리질내, 질내, 직장내, 국소적으로, 종양내, 근육내, 복막내, 피하내, 결막아래, 포낭내(intravesicularlly), 점막내, 심장주위내 (intrapericardially), 탯줄내, 안구내, 경구내, 국소적으로, 지역적으로, 흡입(가령 에어로졸 흡입)을 통하여, 주사 또는 주입에 의해 전달될 수 있다. 전달 경로는 예를 들면, 치료되는 암의 유형 및 이용되는 저해제의 유형에 따라 달라질 수 있다. 추가 측면들에 있어서, 저해제, 가령 당분해, PDG 또는 ARS 저해제는 2회 또는 그 이상(가령, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 회) 투여될 수 있다. 이러한 요법의 투약(doses) 사이의 시간은 변화될 수 있지만, 투약 간에 약 1, 2 또는 3 일, 약 1, 2, 또는 3 주 또는 1 개월 또는 그 이상을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0040] 여전히 추가 구체예에 있어서, 최소한 제 2 요법과 병용하여, 표적이 된 저해제 요법 (가령, 당분해, PDG 또는 ARS 저해제 요법)를 암에 걸린 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 대상을 치료하는 방법이 제시된다. 예를 들면, 제 2 요법은 표적이 된 저해제 요법에 앞서, 이후, 또는 이 요법과 함께 처리될 수 있다. 표적이 된 저해

제 1 요법과 제 2 요법 사이의 시기는 변화될 수 있으며, 요법들 간의 시기는 약 1, 2 또는 3 일, 약 1, 2, 또는 3 주 또는 1 개월 또는 그 이상일 수 있다. 제 2 항암 요법은 외과적 요법, 화학요법, 암 세포-표적이 된 요법, 방사능 요법, 냉동요법, 고체온 치료, 광요법, 고주파절제 요법, 호르몬 요법, 면역요법, 작은 분자 요법, 수용체 키나제 저해제 요법, 항-혈관신생 요법, 사이토킨 요법 또는 생물학적 요법 가령 단클론 항체, siRNA, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 리보자임을 이용한 치료, 또는 유전자 요법을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 추가 측면들에 있어서, 제 2 요법은 추가로 상이한, 당분해 저해제, 가령 제 1 당분해 저해제와 비교하여 상이한 당분해 경로 성분을 표적으로 하는 저해제의 투여를 포함할 수 있다. 추가 측면들에 있어서, 제 2 요법은 미토콘드리아 전자 운반 연쇄 저해제 (가령, 무브리티니브 또는 올리고마이신) 또는 전사 인자 Hif1a의 저해제의 투여를 포함한다.

[0041] 구체예들의 일부 측면들은 대상, 가령 암에 걸린 대상과 관련된다. 본 명세서에서 이용된 것과 같이, 대상은 인간 또는 인간이 아닌 동물 대상 (가령, 개, 고양이, 마우스, 말 등)일 수 있다. 특정 측면들에 있어서, 상기 대상은 암, 가령 구강암, 구강인후암, 비인두암, 호흡기암, 비뇨생식기암, 위장암, 중추 또는 말초 신경계 조직암, 내분비 또는 신경내분비암 또는 조혈성암, 신경교종, 육종, 암종, 임파종, 흑색종, 섬유종, 수막종, 뇌암, 구강인후암, 비인두암, 신장암, 담즙암, 크롬친화세포종(pheochromocytoma), 췌장의 섬 세포 암, Li-Fraumeni 증양, 갑상선암, 부갑상선암, 뇌하수체 종양, 부신 종양, 골원성 육종 종양, 신경내분비 종양, 유방암, 폐암, 두경부암, 전립선암, 식도암, 도관암, 간암, 방광암, 위암, 췌장암, 난소암, 자궁암, 경부암, 고환암, 결장 암, 직장암 또는 피부암을 가진다. 일부 측면들에 있어서, 이 암은 신경교종, 아교모세포종, 핍지신경교종 또는 큰 세포 신경내분비 폐 종양이다. 추가 측면들에 있어서, 이 암은 흑색종, 가령 안구/포도막 흑색종일 수 있다. 추가 측면들에 있어서, 이 암은 전이성 암 또는 최소한 제 1 화학요법에 저항성을 나타내는 암이다.

[0042] 구체예들의 일부 측면은 대상의 암 세포들이 ENO1 유전자의 한 개 복사체를 비활성화시키는 이형접합성 돌연변이를 포함하는지 여부를 결정하는 것에 관계된다. 이 대상의 암 세포들이 이형접합성 돌연변이를 포함하는지 여부를 결정하는데 이용될 수 있는 방법들의 예로는 비활성화 돌연변이 (가령, 결실, 재배열, 치환, 삽입 또는 전도)를 탐지하기 위하여 DNA 시퀀싱, 중합효소 연쇄 반응 (PCR), 핵산 혼성화 (가령, 서든 블랏 또는 현장 혼성화) 또는 DNA 제한절단 분석을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 추가 측면들에 있어서, 구체예들의 방법은 예놀라제 발현 또는 예놀라제 활성의 측정을 포함할 수 있다. 예를 들면, 예놀라제 1 mRNA 또는 단백질의 발현이 측정되고, 참조 발현 수준과 비교되어, ENO1 유전자의 한 개 복사체를 비활성화시키는 이형접합성 돌연변이를 포함하는 지가 결정될 수 있다. RNA 발현을 측정하는 방법들은 핵산 혼성화 (가령, 노던 블랏, 현장 혼성화 또는 어레이(array) 혼성화) 그리고 정량적 역전사 PCR을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 예놀라제 1 단백질 발현을 측정하는 비-제한적 방법들의 예로는 ELISA, 면역분석, 방사능면역분석 (RIA), 면역조직화학, 면역방사능 측정 분석, 플루오르면역분석, 화학적발광 분석, 생물발광 분석, 겔 전기영동, 웨스턴 블랏 분석, 유동 세포분석법, 양성자 방출 단층 촬영법 (PET), 또는 단일 광자 방출 전산화 단층촬영술(SPECT) 부분의 실시를 포함한다. 유사하게, 일부 측면들에 있어서, 상기 예놀라제 1 활성이 측정되고(가령, 기질 촉매현상을 측정함으로써) 그리고 참조 발현 수준과 비교되어, 대상의 암 세포들이 ENO1 유전자의 한 개 복사체를 비활성화시키는 이형접합성 돌연변이를 포함하는지 여부를 판단하게 된다.

[0043] 일부 측면들에 있어서, 생물학적 시료 (가령, 암 세포들 또는 대사산물 또는 이의 핵산을 포함하는 시료)는 구체예들에 따라 분석을 위하여 환자로부터 획득된다. 예를 들면, 생물학적 시료는 혈액, 조직 (가령, 생검), 소변, 대변 또는 타액 시료가 포함되나 이에 한정되지 않는다. 일부 측면들에 있어서, 이 시료는 종양 생검 시료이다.

[0044] 일부 측면들에 있어서, 구체예들의 방법은 이 대상의 암 세포들이 ENO1 유전자 또는 ARS 유전자의 한 개 복사체를 비활성화시키는 이형접합성 돌연변이를 포함하는지를 보고하는 것을 더 포함한다. 추가 측면들에 있어서, 방법은 대상이 당분해 저해제 요법 (가령, 예놀라제 저해제 요법) 또는 ARS 저해제 요법에 대하여 우호적인 반응을 하는 것으로 예상되는지 또는 예상되지 않는 지를 보고하는 것을 포함할 수 있다. 예를 들면, 이러한 보고서는 서면, 전자 또는 구술 보고를 제시하는 것을 수 있다. 일부 측면들에 있어서, 보고서는 대상에게 제시된다. 추가 측면들에 있어서, 보고서는 제 3 자, 가령, 보험회사 또는 건강 관리자(가령, 의사 또는 병원)에 제시된다.

[0045] 구체예들의 특정 측면들은 당분해 저해제 요법 또는 ARS 저해제 요법에 대하여 대상이 우호적인 반응을 할 것인지를 예측하는 것에 관계된다. 예를 들면, 우호적인 반응은 종양 크기 또는 부하의 감소, 종양 성장의 차단, 종양-관련된 통증의 감소, 암 관련된 병리의 감소, 암 관련된 징후들의 감소, 암의 비-진행, 질병 없는 기간의 증가, 진행까지의 증가된 시간, 경감의 유도, 전이의 감소, 환자 생존의 증가 또는 항암 요법에 대한 종양의 민

감성 증가등이 될 수 있다.

- [0046] 여전히 추가 구체예에서, 최소한 제 1 당분해 저해제 (가령, 에놀라제 저해제)와 ENO1 유전자의 한 개 복사체를 비활성화시키는 이형접합성 돌연변이에 대하여 세포들을 테스트하는 최소한 제 1 시약을 포함하는 키트가 제시된다. 예를 들면, 당분해 저해제는 당분해에 공지된 또는 본 명세서에서 설명된 것들중 임의의 것일 수 있다. 일부 측면들에 있어서, 상기 당분해 저해제는 에놀라제 저해제다. 세포들을 테스트하는데 이용되는 시약의 예로는 ENO1 유전자 내에 또는 인접하게 결합되는 핵산 분자 (가령, 올리고뉴클레오티드 프라이머), 항-에놀라제 1 항체와 에놀라제 효소 기질 (가령 라벨된 기질)을 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0047] 유사하게, 추가 구체예에서, ARS 저해제와 ARS 유전자의 한 개 복사체를 비활성화시키는 이형접합성 돌연변이에 대하여 세포들을 테스트하는 최소한 제 1 시약을 포함하는 키트가 제시된다. 세포들을 테스트하는데 이용되는 시약의 예로는 ARS 유전자 내에 또는 인접하게 결합되는 핵산 분자 (가령, 올리고뉴클레오티드 프라이머), 항-ARS 항체와 ARS 효소 기질 (가령 라벨된 기질)을 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0048] 여전히 추가 구체예에 있어서, 상기 에놀라제 저해제 요법의 효과를 관찰하는 방법이 제시되는데, 이 방법은 에놀라제 저해제로 처리된 대상으로부터 획득된 시료 안에 글리세레이트 및/또는 1,3 디히드록시아세톤의 수준을 측정하는 것을 포함하고, 이때 글리세레이트 또는 1,3 디히드록시아세톤의 수준이 참고 수준과 비교하여 상승되지 않은 경우, 이 대상은 추가적인 에놀라제 저해제 요법이 필요하며, 그리고 글리세레이트 또는 1,3 디히드록시아세톤의 수준이 참고 수준과 비교하여 상승된 경우 이 대상은 추가적인 에놀라제 저해제 요법이 필요하지 않다. 일부 측면들에 있어서 에놀라제 저해제 요법의 효과를 관찰하는 방법이 제시되는데, 이 방법은 (a) 에놀라제 저해제로 처리된 대상으로부터 획득된 시료 안에 글리세레이트 및/또는 1,3 디히드록시아세톤의 수준을 측정하고; 그리고 (b) 만약 글리세레이트 또는 1,3 디히드록시아세톤의 수준이 참고 수준과 비교하여 상승되지 않은 경우, 이 대상은 추가적인 에놀라제 저해제 요법이 필요한 것으로 식별되며; 또는 만약 글리세레이트 또는 1,3 디히드록시아세톤의 수준이 참고 수준과 비교하여 상승된 경우, 이 대상은 추가적인 에놀라제 저해제 요법이 필요없는 것으로 식별되는 것을 포함한다. 일부 측면들에 있어서, 구체예들의 방법은 글리세레이트 또는 1,3 디히드록시아세톤의 수준에 근거하여 대상에게 추가적인 에놀라제 저해제 요법을 실행하는 것을 더 포함한다. 일부 추가 측면들에서, 추가적인 에놀라제 저해제 요법은 에놀라제 저해제 요법의 추가 실행이거나 또는 더 높은 분량의 에놀라제 저해제의 투여다. 여전히 추가 측면들에서, 구체예들의 방법은 대상의 글리세레이트 또는 1,3 디히드록시아세톤 수준을 보고하거나 또는 대상이 추가적인 에놀라제 저해제 요법을 필요로 하는 지를 보고하는 것을 더 포함한다.
- [0049] 본 명세서에서 이용된 것과 같이, 단수는 하나 또는 그 이상을 의미할 수 있다. 본 청구범위에서 이용된 것과 같이, 단어 "포함하는(comprising)"과 병용되어 이용될 때, 단수는 하나 또는 하나 이상을 의미할 수 있다.
- [0050] 청구항에서 "또는"의 사용은 양자택일만을 의미한다거나 또는 양자택일이 상호배타적임이 명시적으로 나타나 있지 않는 한, "및/또는"을 의미하지만, 명세서는 오직 양자택일 및 "및/또는"을 언급하는 것으로 정의된다. 본 명세서에서 이용된 것과 같이 "또다른"은 최소한 제 2의 또는 그 이상을 의미할 수 있다.
- [0051] 본 출원을 통하여, 용어 "약(about)"은 장치의 경우 고유한 고유 변화를 포함하는 값, 이 값을 결정하는데 이용되는 방법, 또는 연구 주제에 존재하는 변화를 포함하는 값을 나타낸다.
- [0052] 본 발명의 다른 목적들, 특징들 그리고 장점들은 다음의 상세한 설명에서 자명하게 나타날 것이다. 그러나, 본 발명의 범위 및 사상내에서 다양한 변화들과 변형은 본 상세한 설명으로부터 당업자에게 자명하기 때문에, 본 상세한 설명과 본 발명의 바람직한 구체예들을 나타내는 특정 실시예들은 오직 설명을 위하여 제시된 것임을 인지해야만 한다.

도면의 간단한 설명

- [0053] 다음의 도면들은 본 명세서의 일부를 형성하여, 본 발명의 특정 측면들을 더 설명하기 위하여 포함된다. 본 발명은 본 명세서에서 제시된 특정 구체예들의 상세한 설명과 함께 이들 하나 또는 그 이상의 도면을 참고하면 더 잘 이해될 수 있다.

도 1: GBM에서 1p36 좌위의 동형접합성 결실은 원발성 종양 및 세포 계통에서 ENO1 발현의 상실을 초래한다. a, TCGA로부터 Affymetrix aCGH 데이터는 log2 복사체 수 < -1 (실제 값은 흰색)을 가진 4개의 원발성 GBM들을 보여주며, 이는 1p36 좌위의 동형접합성 결실을 나타낸다. b, DNA 복사체 수는 원발성 GBM들에 걸쳐 mRNA 발현과 강력하게 연관되며; 발현은 ENO1의 복사체 수가 n = 2 인 종양에서 최대이며 (WT, 회색) n = 0(null)인 종양에

서 최저이다. c, D423-MG 세포 계통은 Wellcome Trust Sanger Institute 데이터 세트의 SNP 어레이들을 이용하여 동형접합성 결실임이 식별되었다. d, 웨스턴 블랏팅에 의해 D423-MG와 Gli56 세포들에서 에놀라제 1 단백질의 완전한 부재가 식별되었다. e, D423-MG ENO1 null 세포들에서 ENO2의 shRNA 녹다운으로 생체내에서 두개내 종양생성이 제거되었다.

도 2: ENO2의 shRNA 제거는 ENO1-null에 영향을 주지만, ENO1-WT GBM 세포들에는 영향을 주지 않는다. a, ENO2에 대하여 2가지 독립적인 테옥시사이클린 (Dox)-유도성 TRIPZ 헤어핀(shENO2-3, shENO2-4)에 의한 shRNA 제거로 ENO1 WT (A1207, U87, LN319)와 ENO1-null (D423-MG) 세포 계통 모두에서 에놀라제 2 단백질 수준이 >70% 감소되는 결과를 초래하였다. b, ENO2의 제거는 ENO1-null 성장을 상당히 저해하였지만, ENO1-WT 세포들은 저해되지 않았고, 반면 루시퍼라제에 대항하는 비-표적 shRNA(shLuc)는 임의의 세포 계통에 영향을 주지 못하였다. Dox 유도 와 함께, 또는 Dox 유도 없이 shLuc, shENO2-3, 또는 shENO2-4로 감염된 세포들의 성장 최종점에서 대표적인 플레이트들은 각 세포 계통에 대하여 나란한 성장 곡선을 보여준다.

도 3: 범(pan)-에놀라제 저해제 PhAH에 대한 ENO1-null 세포들의 극단적 민감성. a, PhAH의 농도를 변화시키면서 처리한 후 세포 계통의 크리스탈 바이올렛 착색된 플레이트는 D423-MG와 Gli56 ENO1-null에서는 급성 독성을 나타내지만, 그 ENO1 WT 세포 계통과 정상적인 정상세포들에 대해서는 나타내지 않는다. b, PhAH 치료에 대한 GBM 계통의 민감성은 이들의 전체적인 에놀라제 활성과 광범위하게 관련되어있었다. 용해물(lysates)을 1 μM PhAH로 예비-배양하면 에놀라제 효소 활성이 >95% 저해되었다. c, PhAH 치료는 50 μM 이상의 농도를 제외하고, ENO1 WT GBM 세포들과 정상적인 정상세포들의 성장에 최소 효과를 가졌다. 대조적으로, 낮은 농도의 PhAH는 ENO1-null 세포들의 상정을 멎게 하는데 충분하다. ENO1 이형접합성 세포들 (D502-MG 및 U343)은 PhAH 치료에 대하여 중간 수준의 민감성을 나타내었다. d, 배양 15일 후 PhAH 없이 (좌측) 또는 PhAH 존재하에(25 μM, 우측) 추가적인 GBM 세포 계통과 정상적인 정상세포들의 크리스탈 바이올렛 착색된 플레이트의 대표적인 관찰 사진을 보여준다.

도 4: ENO1 동형접합성 결실된 원발성 종양에서 ENO1 mRNA 발현의 급격한 감소에도 불구하고 당분해-관련된 전사체들에서 전반적인 감소는 없다. a, TCGA GBM 데이터 세트로부터 Affymetrix U133 마이크로어레이 데이터 (y 축 상에 플롯된 log2 절대적 mRNA 발현)는 ENO1 동형접합성 결실된 원발성 종양 (붉은 원)에서 최저 ENO1 발현과 이형접합성 결실된 종양 (녹색 사각)에서 중간 발현을 보여준다. b, 주요 당분해 유전자 GAPDH (y 축) 대 (versus) ENO1 발현 (x 축) 부분의 발현. c, d, ENO3와 ENO2의 발현 대(versus) ENO1 발현; ENO3 발현이 지극히 낮다 (y 축상에 눈금으로 차이를 나타냄). 이들 데이터로부터 얻은 주요 결론은 ENO2 또는 ENO3의 급격한 상보적 상향조절은 없으며 ENO1-결실된 종양에서 GAPDH에서 주요 변경도 없다는 점이다. 이러한 발견들은 ENO1-null 종양에서는 주요 생물에너지학적 재형성은 일어나지 않음을 암시한다.

도 5: ENO2의 녹다운은 ENO1-null GBM 세포들의 성장을 중지시키지만, ENO1 WT GBM 세포들의 성장에는 영향을 주지 않는다. a, pLKO.1 벡터를 통하여 렌티바이러스에 의해 운반된 2개의 독립적인 헤어핀은 D423-MG, ENO1-null GBM 세포 계통에서 비-표적 헤어핀(shNT)과 비교하였을 때 에놀라제 2 단백질 수준을 >80% 감소시키는데 효과적이다. b, ENO2 녹다운의 유사한 수준은 D502-MG, ENO1 WT GBM 세포 계통에서 동일한 2개의 헤어핀을 이용하여 획득된다. 이 2개의 헤어핀은 에놀라제 2를 표적화하는데 있어서 선택적이며, 그리고 에놀라제 1 단백질 수준을 감소시키지 않는다. c, 100h 동안 발광 생존능 분석을 이용하여 획득한 세포 증식 데이터는 독립적인 헤어핀 모두를 이용하여 ENO2를 녹다운 시키면 shNT와 비교하였을 때, ENO1-null 세포의 성장을 상당히 느리게 한다는 것을 나타낸다. d, 동일한 헤어핀으로 처리되고, 동일한 조건하에서 배양된 ENO1 WT 세포들은 ENO2 녹다운과 함께 또는 녹다운 없이 유사한 속도로 증식된다.

도 6: ENO2의 녹다운은 ENO1-null GBM 세포들의 성장을 중단시키고, 시험관 및 생체 종양생성 가능성을 모두 감소시킨다. a, pGIPZ 벡터 (shENO2-3)를 통하여 렌티바이러스에 의해 운반된 헤어핀은 이 세포 계통 D423-MG (ENO1-null)과 D502-MG (ENO1 WT)에서 비-표적 헤어핀 (shNT)과 비교하였을 때, ENO2의 발현을 >70% 감소시켰다. b, 세포 증식은 ENO1 결실 배경에서만 급격히 느려졌다. c, 연결 한천 콜로니 형성 (c)과 생체내 종양생성 성질들(도 2e)은 shNT와 비교하였을 때, shENO2-3에 의해 D423-MG ENO1-null 세포들에서 급격히 또한 감소되었다. 부모 세포 계통은 연결 한천 콜로니 또는 두개내 종양을 형성할 수 없기 때문에, D502-MG 세포들에서 ENO2 제거에 대하여 연결 한천 콜로니 형성 또는 생체내 종양생성 성질이 수집될 수 없다.

도 7: 헤어핀-저항성 ENO2 cDNA 구조체의 발현은 ENO1-null 세포들에서 에놀라제 활성을 복원시키고, shENO2와 PhAH의 유해한 효과들을 저지한다. a, b, 헤어핀-저항성 ENO2 (또는 대조군으로 GFP)를 발현시키는 구조체는 pTRIPZ shENO2-4로 이미 형질유도된 D423-MG 세포들을 감염시키는데 이용되었고, (a) 테옥시사이클린에 의한 헤

어핀 활성화에도 불구하고, 에놀라제 2 단백질의 강력한 발현이 초래되며, 뿐만 아니라 (b) 전반적인 에놀라제 활성이 강력하게 증가된다. c,d, GFP가 아닌 헤어핀-저항성 *ENO2*의 재-발현으로 테옥시사이클린에 의한 sh*ENO2*-4의 유해한 영향이 방지되었다. GFP 대조군 실험에서 sh*ENO2*-4에 의한 성장 저해 정도는 pCMV GFP 감염에 앞서 기존 실험에서 동일한 세포 클론에 의해 획득된 것보다는 다소 더 낮았다(도 3). 이는 연속 배양 동안 *ENO2* 녹다운(도 3의 (a)에서 *ENO2* 녹다운 수준과 비교) 손실 때문이다. *ENO2*의 재-발현은 에놀라제 저해제 PhAH에 대하여 완전한 저항을 또한 부여하였다(전반적인 에놀라제 활성은 WT 세포들에서 보다 훨씬 더 높은 수준으로 복원됨으로써).

도 8: *ENO1* null 세포 계통 D423-MG에서 에놀라제 1의 정규 장소 이외(ectopic)에서 발현은 에놀라제 2 녹 다운의 독성 효과를 저지한다. a, *ENO1* 또는 GFP를 발현시키는 pCMV 렌티바이러스 구조체들은 에놀라제 2를 표적으로 하는 2개의 pTRIPZ 테옥시사이클린 유도성 shRNA (sh*ENO2*-3+4)를 이미 발현시키는 D423-MG 세포들을 감염시키는데 이용되었다. sh*ENO2*-3+4의 테옥시사이클린 유도로 인하여 에놀라제 2 단백질 수준이 대략적으로 80% 감소되었다. b, c, GFP가 아닌 *ENO1*의 정규 장소 이외에서 발현은 테옥시사이클린-매개된 shRNAs의 유도에 의하여 야기되는 독성 효과를 차단한다. b, 각 치료 군의 포화된 플레이트(각 4개씩) 부분의 크리스탈 바이올렛 착색. c, IncuCyte 살아있는 성장 곡선들은 평균 합류 (4개씩 +/- S.E.M.)를 보여준다.

도 9: *ENO1*-null 세포 계통에서 *ENO1*과 *ENO2*의 정규장소 이외의 발현에 의한 PhAH 독성의 분량-의존적 탈환. a, Gli56 *ENO1*-null 세포들은 GFP, *ENO1*또는 *ENO2*를 함유하는 pCMV 렌티바이러스 구조체로 감염되었는데, 이는 GBM 계통(U87)에서 나타낸 수준과 필적하는 *ENO1* 발현과 *ENO2*의 강력한 과다발현을 산출하였다. b, 에놀라제 1의 발현과 에놀라제 2의 과다발현은 PhAH의 유해한 영향으로부터 Gli56 세포들을 상당히 보호하였다. c, D423-MG *ENO1*-null 계통에서 바이러스 역가 수준을 변화시키면서, 동일한 실험이 실행되었다. pCMV *ENO1*의 6가지 상이한 역가와 pCMV *ENO2*의 두 가지 상이한 역가는 등급화된(graded) 수준의 에놀라제 발현 및 활성을 산출하였다. d, 에놀라제 1의 도입은 PhAH의 독성 영향으로부터 이들 세포를 보호하였고, 치사되는데 요구되는 저해제 농도(14일 배양후)는 에놀라제 1 발현과 효소 활성 수준과 직접 비례되게 증가되었다. 에놀라제 2 과다 발현의 2가지 수준에 대해서도 동일한 패턴이 획득되었다.

도 10: 1p36 동형접합성 결실된 *ENO1*-null 세포들은 수용체 티로신 키나제 저해제들에 대해 민감하지 않다. 수용체 티로신 키나제 (RTK) 저해제들 소라페니브(sorafenib), 라파티니브(lapatinib), 및 PHA665752의 조합의 상이한 농도 존재하에 각 세포 계통의 상대적인 성장은 PhAH 실험(도 4)과 나란하게 분석되었다. *ENO1*-null D423-MG 세포들(붉은 선과 표식들)은 *ENO1* WT GBM 세포 계통보다 RTK 저해제들의 조합에 대해 민감하지 않았다.

도 11: 범(pan)-에놀라제 저해제 PhAH에 대한 *ENO1* 이형접합성 세포들의 민감성. PhAH의 농도를 증가시키면서 처치 후 WT(LN319) 또는 *ENO1* 이형접합성(502 또는 U343) 세포 계통의 크리스탈 바이올렛 착색된 플레이트. 낮은 농도의 PhAH도 *ENO1* 이형접합성 세포들(D502-MG와 U343) 부분의 성장을 저해시키는데 충분하다.

도 12: PhAH에 대한 U343 세포들의 민감성은 감소된 *ENO1* 발현 때문이다. a, PhAH에 대한 *ENO1* 이형접합성 세포들(U343) 부분의 민감성은 *ENO1* 또는 *ENO2*의 정규 장소 이외의 발현에 의해 부분적으로 가역적이었다. b, PhAH에 대한 *ENO1* 이형접합성 세포들(U343) 부분의 민감성은 ATP 합성효소 저해제 올리고마이신(10 nM) 부분의 존재하에 강화되었다. 자체에서 올리고마이신은 최저 효과를 보유했었지만, PhAH와의 조합은 U343 세포들에 대해 상당한 독성이 있었다. 다시, 이 효과는 *ENO1* 또는 *ENO2* 정규 장소 이외의 발현에 상보성에 의해 대개 역전되었다.

도 13a-b: 정상적인 인간 정상세포들과 비교하였을 때, 올리고마이신과 함께, 또는 올리고마이신 없이, PhAH에 대한 U343 세포들의 증가된 민감성. U343 *ENO1* 이형접합성 세포들은 정상적인 인간 정상세포들과 비교하여 유사한 성장 저해를 획득하기 위하여 약 8배 더 낮은 PhAH 투여분량을 요구한다, (a) PhAH 투여분량을 증가시킨 것에 반응하여 정상적인 인간 정상세포들과 U343 세포들의 성장 곡선, 그리고 (b) 미토콘드리아 전자 전달 연쇄 저해, 올리고마이신(2.5nM)과 결합시킨 경우.

도 14: 다양한 대사산물은 *ENO1* 결실된 종양이 에놀라제 2 저해제로 처리될 때 치료 효과를 관찰하기 위한 잠재적인 생물표식들이다. 세포 용해물의 대사체학 분석에서 에놀라제 저해제 PhAH로 처리할 때, 글리세레이트와 에탄올아민 수준은 *ENO1* null 세포 D423MG에서 증가된 반면에, 이들 수준은 *ENO1* 야생형인(패널 a와 b) U87 세포들에서는 변화가 없는 것으로 나타났다. 이들 대사물은 치료 동안 환자의 혈청에 축적될 수 있고, 질환 경감을 평가하는 비-침습성 방식으로 이용될 수 있다. 2개의 독립적인 헤어핀을 이용하여 *ENO1* null 세포(D423MG)에서 녹다운 될 때 젖산염 수준은 감소된다(패널 c). 젖산염은 치료 반응을 관찰하는데 이용되는 또다른 잠재적

생물표식이다. 종양에서 젓산염 수준은 MR 분광기 영상을 이용하여 탐지될 수 있으며, 젓산염 피크의 감소는 종양 세포 사멸과 관련될 수 있다.

도 15: 에놀라제 저해제 PhAH는 미토콘드리아 대사의 저해제들 가령 올리고마이신, 안티마이신 A와 로테논과 함께 ENO1 null 세포 사멸에서 공조 효과를 발휘한다. ENO1 null 세포들은 PhAH와 미토콘드리아 저해제들을 이용한 치료에서 인간 정상세포들보다 더 민감하다. 루시페라제 분석에 의해 측정하였을 때, D423MG 계통의 세포 생존능은 미토콘드리아 저해제들이 단독으로 이용되었을 때보다 PhAH와 복합될 때 상당히 더 낮다. 이 효과는 ENO1 null 세포들에서 에놀라제 2의 과다발현에 의해 탈환된다. 인간 정상세포들에서 이러한 효과는 또한 볼 수 없다. 이러한 발견은 ENO1 동형접합성 결실을 가진 종양을 치료하기 위하여 미토콘드리아 저해제들과 복합하여 에놀라제 저해제의 가능성을 증가시킨다. 각 치료에서 테스트된 세포들은 423 pCMV GFP (ENO1 null); 423 pCMV ENO2 (ENO1 null 세포들, 이때 에놀라제 활성은 ENO2의 과다 발현에 의해 복원됨); 그리고 정상세포들 (좌측에서 우측 방향으로)이다.

도 16: 필수 대사/하우스키핑 유전자들에서 동형접합성 결실은 종양이 중복 상동체를 표적으로 하는 분자에 민감하게 만든다. 많은 필수 대사 과정들은 많은 유전자들에 의해 실행되어, 한 구성원의 종양 발달 동안 우연한 동형접합성 결실은 이 시스템에 최소한의 파괴를 야기한다(패널 a). 그럼에도 불구하고, 특이적 저해제에 의해 제 2의 중복 상동체가 표적이 되는 경우, 필수 대사 과정은 결실이 있는 종양에서 제기능을 발휘하지 못하지만, 유전적으로 정상적인 고유 조직은 종양-특이적으로 결실된 상동체가 여전히 기능을 하기 때문에 영향을 받지 않는다 (패널 b). 이러한 일반적인 개념의 특이적 예가 아교모세포종에서 ENO1 동형접합성 결실이다. ENO2는 여전히 발현되기 때문에, ENO1 동형접합성 결실은 종양에 견딜 수 있지만(패널 c), 그러나 ENO2의 특이적 저해제는 ENO1 null 종양 세포들에서 완벽하게 에놀라제 활성을 폐기시켜야 하지만(항후 당분해와 ATP 합성이 차단됨), 계놈상으로 고유한 정상적인 조직들은 영향을 받지 않도록 남겨둔다 (패널 d).

도 17: 주요 종양 억제자를 표적으로 하는 동형접합성 결실은 필수 대사/하우스키핑 유전자들을 포함할 수 있다. 다수의 상이한 암에서 빈번한 그리고 재발성 동형접합성 결실을 나타내는, 10q23 (PTEN)과 9p21 (Ink/arf) 을 포함하는 몇 가지 좌위가 공지되어 있다. 이 도면은 다중 원발성 종양에서 10q23 좌위 주변에 SNP-어레이 (복사체 수) 변화들을 보여준다. 결실은 크기 및 경계에서 광범위하지만, 모두 PTEN에 고정된다. 이러한 유형의 "최소한으로 공통된 영역패턴"은 결실에 의해 표적화된 중요한 종양 억제자 유전자의 플레그(flag)로 광범위하게 연구되어왔다(Maser 외, 2007). 꽤 주목을 받지 못한 것은 이들 결실 일부가 상당히 클 수 있으며, 이 세포에서 중복 역할을 한다면 중요할 수 있는 다수의 비-표적, 비-종양 억제자 유전자들 ("패신저"(passenger))를 제거할 수 있다는 점이다. 이들 대부분 패신저 결실된 유전자들은 종양 조직과 무관하고 종양조직에서 발현되지 않지만(가령 인터페론, 테펜신), 편재되어 발현되는 다수의 대사 유전자들은 PTEN과 함께 공동-결실되고, PTEN으로부터 거리가 멀어지면서 빈도는 감소된다. 이들은 ATAD1 (기능을 알 수 없는, 매우 보존된 미토콘드리아 AAA 및 ATPase), MINPP1 (당분해에 역할을 하는 이노시톨 폴리포스페이트 포스포타제, 리보플라빈과 탄수화물 대사, Cho 외, 2008) 그리고 PANK1 (판토테네이트 키나제, 코엔자임 A의 생합성에 제 1 단계, 아세틸 전달 반응의 필수 공-인자들, 지방산 산화 및 지질 생합성, 가령, Leonardi 외, 2010a 그리고 Leonardi 외, 2010b, 이들의 전문이 명세서의 참고자료에 포함된다)을 포함한다.

도 18: 주요 종양 억제자로 결실된 필수 중복 하우스키핑 유전자들의 또다른 예들. 이 도면은 주요 종양 억제자인 INK/ARF 좌위 주변 염색체 9에서 복사체 수 변화를 나타낸다. 이 경우, TCA 사이클 효소 아코니타제 1을 인코딩하는 유전자 ACO1은 INK4a/ARF와 함께 결실된다. 패널 a는 두 개의 별도 흑색종 데이터 세트에서 ACO1은 두 명의 환자 시료에서 동형접합성으로 결실됨을 보여준다. 패널 b는 이러한 동형접합성 결실이 356명의 아교모세포종 환자들중 2명에서(2/356)에서도 또한 발생됨을 보여준다. 아코니타제 1은 우리의 치료 전략에 적합한 전망있는 표적이 되는 또다른 중요한 항시발현 유전자다.

도 19: 계놈 복사체 수는 TARS의 발현과 연관성이 있다. c. Sanger COSMIC 웹사이트 (a)에서 얻고, 실험 연구 (c)에 의해 식별된 계놈 복사체 수 데이터는 SK-MEL-2 세포 계통에서 TARS의 이형접합성 결실을 보여준다. (a) 부분의 숫자는 DNA 복사체 수를 나타낸다. b, DNA 복사체 수는 TARS의 mRNA 발현과 연관성이 있다. 검은 상자는 SK-MEL-2 세포 계통을 나타낸다.

도 20: TARS 결함 흑색종 세포들에서 TARS 저해제 보렐리딘에 대한 증가된 민감성. a, SK-MEL-2 세포 계통은 TARS에 대한 이형접합성 결실을 보유하고 있으므로 식별되었고; 451 Lu 세포 계통은 TARS에 결함이 있는 것으로 식별되었고; 그리고 SK-MEL-5와 HMEL 세포 계통은 TARS 유전자에 대하여 야생형인 것으로 식별되었다(CCLE-Broad 웹사이트로부터 얻은 데이터). b, 보렐리딘 치료는 낮은 농도에서 HMEL과 SK-MEL-5 세포들의 성장에 최소 영향

을 보유하였다. 대조적으로, 낮은 농도의 보렐리딘은 SK-MEL-2 세포들의 성장을 중단시켰다. 451 Lu 세포들은 보렐리딘 치료에 대해 중간수준의 민감성을 보였다. c, TARS의 발현 수준은 웨스턴 블랏팅에 의해 식별되었고, 보렐리딘에 대한 민감성과 상당히 연관성이 있음을 나타낸다.

도 21: 생존 성장 곡선(SK-MEL-2에 대한 낮은 초기 세포 밀도)은 TARS 결함 흑색종 세포들에서 TARS 저해제 보렐리딘에 대한 민감성이 증가됨을 보여준다. SK-MEL-2 (TARS Het); SK-MEL-5 (TARS WT); 451 Lu (TARS 결함); HMEL (TARS WT).

도 22: 생존 성장 곡선(SK-MEL-2에 대한 초기 높은 세포 밀도)은 TARS 결함 흑색종 세포들에서 보렐리딘의 세포 독성이 증가됨을 보여준다. SK-MEL-2 (TARS Het); SK-MEL-5 (TARS WT); 451 Lu (TARS 결함); HMEL (TARS WT).

도 23: 보렐리딘에 대한 증가된 민감성은 TARS 결함 흑색종 세포들에서 TARS의 정규 장소 이외의 과다발현에 의해 역전된다. a, b, GFP 또는 CHEK1가 아닌 TARS의 정규 장소 이외에서 발현은 SK-MEL-2 세포들에서 보렐리딘에 의해 야기되는 독성 효과를 저지한다. a, GFP를 발현시키는 pCMV 렌티바이러스 구조체는 SK-MEL-2 세포들을 감염시키는데 이용되었다. b, TARS를 발현시키는 pCMV 렌티바이러스 구조체는 SK-MEL-2 세포들을 감염시키는데 이용되었다. c, 보렐리딘에 대한 SK-MEL-2 세포들의 민감성은 GFP 또는 CHEK1가 아닌 TARS의 정규 장소 이외에서 발현에 의해 역전되었다. d, 웨스턴 블랏은 TARS를 포함하는 pCMV 렌티바이러스 구조체로 감염은 SK-MEL-2 세포들에서 높은 수준의 TARS 발현을 얻는다는 것을 보여준다.

도 24: TARS 복사체 수/mRNA 발현과 보렐리딘에 대한 민감성 사이의 강력한 상관관계. 암 세포 계통 패널의 보렐리딘에 대한 민감성 (IC₅₀, M log₁₀, y-축)은 NCI-60 데이터베이스로부터 얻었고, CCLE-Broad 데이터세트로부터 얻은 TARS 계놈 복사체 수 (A, x-축) 또는 mRNA 발현 (B, x-축)에 대한 함수로 플롯되었다. SK-MEL-2 세포 계통 (질은 음영)은 최저의 복사체 수를 보유하고, 두 번째로 낮은 TARS mRNA 발현을 보유하고, 따라서 보렐리딘에 대하여 최적 IC₅₀(최대 민감성)을 보유한다. 실험 연구에 의해 생성된 addymetrix aCGH 데이터에 근거하여 복사체 수는 SK-MEL-2 (C)에서 TARS의 복사체 수 손실을 식별한다.

도 25: 계놈 복사체 수는 광범위한 ARS 유전자들에 대한 발현 수준과 관련된다. 그래프는 DNA 복사체 수는 AARS (a), KARS (b), HARS (c) 및 LARS (d) 부분의 mRNA 발현과 상관관계가 있다는 것을 보여준다.

도 26: CHEK1 단백질 발현은 계놈 복사체 수와 관련되지 않고, 그리고 CHEK1의 과다발현은 CHEK1 저해제, AZD7762에 대한 저항성을 부여하지 않는다. a, COMIC (Sanger Center)에서 얻은 계놈 복사체 수는 염색체 11상의 CHEK1 (박스표시됨)이 세포 계통SK-MEL-2에서 오직 한 개의 복사체만을 보유한다는 것을 나타낸다. b, 마이크로어레이 발현과 어레이 CGH 복사체 수 데이터는 ~900개 세포 계통 (SK-MEL-2는 상자로 표시됨)에서 mRNA 수준과 CHEK1의 복사체 수 사이에 우수한 상관관계를 보여준다. c, 그러나, SK-MEL-2 세포들은 웨스턴 블랏에 의해 더 낮은 수준의 CHEK1 단백질을 발현하지 않는다. d, SK-MEL-2 세포들에서 CHEK1의 과다발현은 CHEK1 저해제인 AZD7762에 저항성을 부여하지 않는다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

I. 본 발명

[0054]

계놈의 큰 영역의 결실 (가령, 이형접합성 결실)은 암에서 원형질성 체세포 사건이며, 이 사건은 중요한 종양 억제자 유전자들의 기능이 제거됨으로써 종양생성을 일으킨다. 이들 결실은 흔히 암 병인에서 알려진 역할이 없는 이웃 유전자들을 포괄하는데, 많은 경우에 필수 대사 효소들을 인코딩하는 필수 유전자들이 포함된다. 그러나, 종양 세포들에서 효소 활성의 일부 상실(가령, 50% 상실)은 필수, 하우스키핑 유전자들의 경우에서조차도 일반적으로 용인된다. 이러한 이유중 한 가지는 대부분의 대사 효소들이 방대한 양으로 존재하고, 독성은 중요한 임계치 아래로 발현이 상실될 때 독성 의존성이기 때문이다. 암 세포들에서 임의의 영향을 가지기 위하여 일반적으로 활성의 50%를 훨씬 넘는 상실이 요구된다.

[0055]

본 출원에서 제시된 연구들은 ENO1 유전자의 한 개 복사체의 이형접합성 비활성화는 암 세포들이 당분해 경로 저해제들에 대하여 절묘하게 민감하도록 만든다고 설명한다. 역으로, ENO1의 두 개 복사체를 보유하는 암 세포들에서, 암 세포 성장에서 임의의 영향을 가지기 위해서 매우 높은 수준의 당분해 저해제들이 필요하다. 따라서, 이형접합성 ENO1 비활성화를 가진 암 세포들은 다른 방법에서 요구되는 것보다 훨씬 더 낮은 농도의 당분해 저해제들에 의해 효과적으로 처리될 수 있다. 예를 들면, ENO1의 이형접합성 결실(U343과 D502-MG)을 보여주는 야교모세포종 세포들은 ENO1-WT 야교모세포종 세포 계통과 정상적인 인간 정상세포들과 비교하였을 때, 에놀라제 저해제, 포스포아세토히드록사메이트 (PhAH)에 2-8배 더 민감하다(도 3b-c와 도 11 참고). 이 효과는

[0056]

ENO1 또는 ENO2를 발현시키기 위한 백터를 세포들에게 보충함으로써 최소한 부분적으로 역전가능하였고, 이 결과는 암 세포들 안에 감소된 수준의 에놀라제 발현 때문인 것으로 설명된다. 중요한 것은, PhAH에 대한 세포의 민감성은 올리고마이신으로 공동-처리에 의해 더 강화될 수 있다(도 12).

[0057] 이들 연구에서, 하우스키핑 유전자들 가령 ARS, PDG 또는 ENO1의 이형접합성 비활성화는 항암 요법을 지도하는데 적합한 생물지표가 될 수 있다. 예를 들면, 이러한 ENO1의 이형접합성 결실을 보유하는 것으로 판단된 암 환자는 당분해 저해제 (가령, 에놀라제 저해제) 또는 이러한 저해제의 프로드럭으로 치료될 수 있다. 유사하게 ARS 유전자의 이형접합성 결실을 보유하는 것으로 판단된 암 환자는 ARS 저해제로 치료될 수 있다. 바람직하게는, 이들 환자는 제 2 요법 (가령, ENO1의 경우 제 2 당분해 저해제 또는 미토콘드리아 운반 저해제, 또는 ARS의 경우 단백질 합성 저해제)과 병용되어 치료받고, 이로 인하여 이들 암 세포에서 특이적 저해제의 효과가 더 강화될 수 있다. 유사하게, 환자가 특이적 저해제 요법에 반응할 가능성이 있는 지를 예측하기 위하여, 또는 적용되어야 하는 요법의 투약량(dosage)을 예측하기 위하여, ENO1 또는 ARS의 이형접합성 비활성화에 대하여 환자의 암 세포들이 분석될 수 있다. 이들 방법은 특정 환자와 이 환자의 특정 암에 항암요법을 맞출 수 있다. 따라서, 이 요법은 더 효과적인이라는 것을 증명해야 하고, 뿐만 아니라 이 요법의 부작용들은 많은 부작용과 검증안된 효과를 가진 "표준" 치료를 단순히 적용하는 것보다 효과적이라는 것을 식별함으로써 상당히 감소될 수 있다.

[0058] 본 발명의 구체예들은 암 세포 특이적 치료를 만들기 위하여 정상 조직과 암 조직 간에 유전적으로 측정된 대사 차이들을 활용한다. 구체적으로, 본 발명의 측면들은 중복 필수 하우스키핑 유전자들의 동형접합성 결실이 암-특이적 취약성을 만든다는 놀라운 발견에 일부 근거한다. 이들 유전자에 의해 인코딩된 단백질들의 활성의 완전한 상실과 세포 사멸은 결실되지 않은 상동체(homolog)에 대한 선택적 저해제 또는 두 상동체를 모두를 표적으로 하는 화합물을 결실된 조직과 결실되지 않은 조직 간을 구별짓는 투여 분량으로 투여함으로써 획득된다. 이 방법을 이용하면, 두 유전자들이 고유한 상태로 발현되는 정상 세포의 건강은 영향을 받지 않는다.

[0059] 암 계놈들은 각각 다수의 중복과 결실을 표적으로 하는 드라이버 종양유전자와 종양 억제자 유전자들에 의해 특징된다. 암 유전자들을 표적으로 하는 이들 복사체 수 변경은 발암 과정에서 직접적인 역할을 하지 않는 이웃 유전자들의 복사체 수의 변화에 항상 관련된다. 이점에서, 필수 하우스키핑 유전자들의 동형접합성 결실이 일어난 암 세포에서 잠재적인 독특한 취약성이 평가되도록 기획된 전략에서 이러한 병립(collateral) 사건들이 활용된다. 무척추동물 뿐만 아니라 마우스에서 다량의 유전적 상호작용 연구에서 많은 필수 세포의 항시발현 기능들은 하나의 상동체 상실에 직면할 때 세포는 생존할 수 있지만, 다중 상동체가 상실될 경우 완전히 치사되는 중복 기능을 인코딩하는 다중 상동체 유전자들에 의해 실행된다는 것이 설명된다(가령, 도 16 및 Deutscher 외, 2006; DeLuna 외, 2008; Costanzo 외, 2010; Vavouri 외, 2008; 그리고 Brookfield 외, 1997 참고, 이들은 각 전문가 명세서의 참고자료에 포함된다). 이러한 개념적 골격에서, 중복 필수 하우스키핑 유전자들의 동형접합성 결실은 암-특이적 취약성을 만들 수 있고, 이로 인하여 결실되지 않은 제 2 상동체의 약리학적 비활성화는 결실을 가진 종양 세포에서 활성의 완전한 상실을 초래하고, 두 유전자들이 고유한 상태로 발현되는 정상 세포들의 건강은 손상시키지 않을 것이라고 생각되었다(도 16a). 이러한 유전자들을 조사하기 위하여, GBM의 고-해상 종합적 TCGA 데이터셋이 검사되었다(표 1 및 The Cancer Genome Atlas Research Network 2008).

[0060] 병립-취약성(collateral-vulnerability) 접근법의 개념에 대한 유전적 그리고 약리적 증명은 CHD5와 CAMTA1을 포함하는 몇 가지 후보 종양 억제자 유전자들과 함께 GBM에서 빈번한 결실을 겪는 영역인 1p36 좌위에 존재하는 ENO1 유전자를 통하여 본 명세서에서 제시된다 (도 1a; Henrich 외, 2011 and Bagchi 외 2008). 1p36 좌위는 GBM중의 1-5%가 동형접합성 결실되고 (뿐만 아니라 펩지신경교종 및 거대세포 신경내분비 폐 종양, 가령, The Cancer Genome Atlas Research Network 2008; Yin 외, 2009; Duncan 외, 2010; Kotliarov 외, 2006; 그리고 Peng 외, 2005) 그리고 ENO1 유전자의 동형접합성 결실에도 흔히 관련된다. 3가지 상동성 유전자들에 의해 인코딩된 에놀라제는 2-포스포글리세린산을 포스포에놀피루베이트로 전환시키는 당분해의 최종 단계의 바로 전 단계를 촉매하는 필수 효소다(Poyner 외, 1992). 포유류에서, 에놀라제 활성은 다음의 3가지 유전자들에 의해 인코딩되는데: 도체에서 발현되는 ENO1, 신경 조직에서 독점적으로 발현되는 ENO2, 그리고 근육 조직에서 발현되는 ENO3(표 2). 따라서, 정상 세포와 특히 종양 세포들에서 에너지 생산에 있어서 당분해의 결정적 중요성을 감안하면 (Wise 외, 2010), ENO1에 대한 GBM 종양 동형접합성 null은 에놀라제 2의 저해에 매우 민감할 것으로 예상되며, 한편 정상적인 뉴런 조직들은 에놀라제 1의 기능적 과잉에 의해 구제(rescue)될 것이다(도 16b). 상응하여, ENO2 녹아웃 마우스는 생존하며, 번식할 수 있는데, 이는 에놀라제 2의 약리학적 저해가 잘 용인되는 것임을 암시한다(표 2). 더욱이, 몇 가지 에놀라제-상동체를 보유하는 S. 세르비시예(*S. cerevisiae*)는 한 개 돌연변이를 가진 약한 표현형을 나타내고, 모든 상동체들이 결실된 경우에만 세포 치사가 발생된다(Deutscher

외, 2006; DeLuna 외, 2008; 그리고 Costanzo 외, 2010). *C. 엘라간스(C. elegans)*와 초파리(*Drosophila*)는 에놀라제 활성을 인코딩하는 오직 하나의 유전자를 보유하여, 이의 결실은 치명적이다(Buszczak 외, 2007 및 Sonnichsen 외, 2005).

[0061] 본 명세서에서 설명된 유전적 그리고 약리학적 결과들로부터 에놀라제 2 저해는 1p36 동형접합성 결실과 ENO1의 병립 상실을 가진 세포들에서는 치명적이며, 한편 ENO1 고유한 세포들은 당분해를 거치고, 생존을 지원하기 위하여 에놀라제 1에 의존할 수 있다는 것이 설명된다. 몇몇 동형접합성 결실된 하우스키핑 유전자들이 1p36 상에서 동일한 결실이 발생할 수 있음을 감안하면(가령 H6PD, 표 1), ENO2의 저해와 동시에 결실된 하우스키핑 유전자의 또다른 상동체의 저해와 복잡됨으로써 효과 및 암-세포 특이적 사멸을 더 증가시킬 가능성이 있다.

[0062] 실제로, 병립 취약성은 ENO1 이외에, 다른 패신저-동형접합성 결실된 하우스키핑 유전자들로 확장될 수 있다. GBM, 9p21 (CDKN2A) 및 10q23 (PTEN)에서 주요 동형접합성 결실된 좌위는 기능적-중복 하우스키핑 유전자 패밀리의 구성원인 상당수의 결실된 패신저 유전자들을 포괄한다(표 1, 도 17). 중요한 것은, 이들 화합물중 많은 것들이 암 치료에 있어서 완전히 새로운 분자 실체라는 것이다. 한 평가에 따르면, 인간 게놈에서 단백질을 코딩하는 모든 유전자의 11%는 인간 암들에서 결실된다 (Bignell 외, 2010). 따라서, 많은 상이한 유형의 암에 걸쳐 상당수의 동형접합성 결실이 수백개의 유전자에 걸쳐있다는 점을 감안하면(Bignell 외, 2010; Taylor 외, 2010; Cox 외, 2005; 그리고 Tonon 외, 2005), 본 명세서에서 설명된 GBM에 대한 패러다임은 많은 추가 암 유형의 개인맞춤화된 치료 개발에 적용될 수 있을 것이다.

[0063] 결실되지 않은 상동체들의 특이적 저해제들은 이미 이용가능한 범-효소 저해제들의 화학적 변형 (표 3) 또는 이용가능한 작은 분자 라이브러리를 이용한 고-처리량 스크리닝에 의해 발견될 수 있다. 각 효소에 대한 특이 활성 분석에 의해 저해가 탐지될 수 있다. 예를 들면, 에놀라제의 경우, 피루베이트 키나제와 LDH 연결된 분석을 이용한 다음과 같이 NADH 산화와 관련된다. H6PD의 경우 NADPH 생산을 측정함으로써 실행될 수 있다(Clarke 외, 2003, 이의 전문이 명세서의 참조자료에 포함된다). 아코나타제 활성은 이소시트레이트 데히드로게나제 연결된 반응에서 NAPD+ 환원을 관찰함으로써 측정될 수 있다 (Bulteau 외, 2005, 이의 전문이 명세서의 참조자료에 포함된다). 판토테네이트 키나제 활성은 ¹⁴C 라벨된 판토테네이트로 효소를 항온처리하고, 신틸레이션 카운팅에 의해 방사능활성 산물을 정량화함으로써 측정된다(Zheng 외, 2008, 본 명세서에서 참조자료로 편입됨). KIF 활성은 ATPase 분석을 이용하여 측정할 수 있다.

[0064] 필수 대사 하우스키핑 유전자들에서 동형접합성 결실을 가진 종양은 종양 조직의 복사체 수 분석 또는 효소 분석을 이용하여 수술-후 또는 생검으로 진단될 수 있다. 예를 들면, 에놀라제의 경우, 종양 조직과 정상적인 조직에서 에놀라제 1과 2 활성 분석을 진행하는 것이 가능하다(Poyner 외, 1992). 적합한 치료 표적인 종양은 정상적인 에놀라제 2 활성과 함께 거의 탐지불가능한 에놀라제 1 활성을 보유한 것으로 식별될 것이다. 이것은 다른 대사 효소들로 연장될 수 있다. 이러한 바로 이용가능한 효소 분석을 보유하지 못한 단백질들의 경우, 종양 시료의 복사체 수 분석이 진단 방법으로 이용될 수 있다. 본 연구에서, 에놀라제 1의 경우 이것이 진짜 동형접합성 결실을 탐지하는 효과적인 방법임을 보여주었는데, 그 이유는 복사체 수에 근거한 동형접합성 결실을 보여준 시료는 거의 탐지불가능한 수준의 에놀라제 1 발현을 보유하기 때문이다.

[0065] 치료하는 동안, 비-침습성 영상화 또는 대사 프로파일링에 의해 반응을 관찰할 수 있다. 예를 들면, 아교모세포종에서 에놀라제 저해의 경우 MR 분광기 영상화(MRSI)는 사용하기에 효과적인 도구일 것이다. 이 기술은 뇌 종양 유형들간을 구별하는데 이용되어 왔으며, 또한 예후의 단계 및 예측에 잠재적 용도를 또한 가진다(Nelson 외). 이 기술은 MRI와 NMR 분광기를 복합하여, 다양한 대사산물, 그 중에서 콜린, 크레아틴, N-아세틸아스파르테이트, 젖산염 및 지질의 수준 탐지 및 공간적 분포를 탐지함으로써 조직 대사 프라파일에 대한 정보를 제공한다(Nelson 외). 젖산염 피크는 혐기성 대사 영역에 대응하며, 많은 연구에서 아교모세포종에서 상당히 현저한 것으로 발견된다(Moller-Hartmann 외; Law). 본 명세서에서 제시된 데이터는 젖산염 수준이 시험관내 ENO1 결실된 세포들에서 에놀라제 2 저해 이후 상당히 감소됨을 보여준다(도 14c). 치료에 성공적인 반응을 보이는 환자들은 기준과 비교하였을 때 종양 젖산염 수준이 감소될 것이다. 대안으로, 치료 전 후 혈청 대사산물의 분석이 가능할 수 있다. 기존 연구들에서 혈청 또는 소변 대사 프로파일링에 근거하여 양성 상태를 가진 건강한 환자들로부터 암 환자를 구별해낼 수 있음을 보여주었다. 이는 난소 암에서부터 간세포 암종에 이르는 광범위한 다양한 암에 유효하다(Chen 외; Odunsi; Spratlin 외). 치료시 종양 대사 변화들은 혈청 대사산물 특히 표적 단백질의 상류 또는 하류에 있는 대사산물의 변화로 탐지될 수 있다. 이 방법에서 치료 효과를 관찰하기 위한특이적 생물지표들이 발견되고 이용될 수 있다. PhAH로 처리된 D423MG ENO1 null 세포들의 초기 대사 특징은 글리세레이트의 상당한 상향조절로 나타난다 (도 14a). 글리세레이트는 에놀라제 블록의 바로 상류 축적으로 예상되는

중간생성물인 2-포스포글리세레이트와 3-포스포글리세레이트의 자발적 가수분해 결과로 유사하게 생성된다(도 14c). 글리세레이트는 정상 혈청과 뇌척수액에서는 안정적이며, 풍부성이 낮으며, 향후 저해제 효과의 잠재적 표식이 될 수 있다.

[0066] 더욱이, 동형접합성 결실된 하우스키핑 유전자들의 저해제들은 다른 화학요법 치료와 병용하여 이용될 수 있다. 세포 사멸에서 공조 효과를 이끄는 유사한 경로들에 작용하는 두 가지 화합물을 이용하는 것이 가능할 것이다. 예를 들면, ENO1 null 세포들에서 에놀라제 저해제는 미토콘드리아 대사의 저해제들, 가령 올리고마이신, 안티마이신 A와 로테논과 공조 효과를 가진다는 것을 데이터에서 볼 수 있다 (도 15). 이 효과는 ENO1 야생형 세포에서는 볼 수 없고, ENO1 null 세포들에서 에놀라제 2의 과다 발현에 의해 구제된다. 추정되는 공조 상호작용의 추가적인 목록은 표 3에서 볼 수 있다.

[0067] 따라서, 본 발명은 기능적 중복 상동체를 보유한 하우스키핑 유전자에서 동형접합성 결실을 보유하는 세포에서 암을 치료하거나 또는 세포 사멸을 유도하는 방법들을 제시하는데, 이 방법은 중복 상동체의 저해제 또는 양쪽 상동체의 저해제의 적합한 투여분량을 대상에게 투여하거나 세포에 접촉시키고, 이로 인하여 두 상동체중 하나가 부족한 세포는 이 경로의 치료적으로 관련된 저해 수준에 도달하기 위하여 더 낮은 수준(개념적으로 건강하고유 경우보다) 부분의 이 저해제를 요구한다.

[0068] II. 정의

[0069] "하우스키핑 유전자(housekeeping gene)"는 기본적인 세포 기능의 유지에 요구되는 유전자를 의미한다.

[0070] 본 명세서에서 이용된 것과 같이, "동형접합성 결실(homozygous deletion)"은 유전자의 두 대립형질이 모두 결실됨을 나타낸다.

[0071] 본 명세서에서 이용된 것과 같이, "이형접합성 결실(heterozygous deletion)"은 유전자의 대립형질중 하나만 결실됨을 나타낸다.

[0072] 본 명세서에서 이용된 것과 같이, 주어진 유전자의 "기능적 중복 상동체(functionally redundant homologue)" 또는 "기능적으로 중복성인 상동체(functionally redundant homolog)"는 주어진 유전자와 실질적으로 동일한 기능을 수행하는 유전자를 지칭한다. 예를 들면, 효소를 인코딩하는 유전자의 경우, 기능적 중복 상동체는 대사 경로에서 동일한 단계에서 동일한 기질(들)에 작용하는 효소(가령, 동일한 EC 수를 보유한 효소들)를 인코딩할 수 있다.

[0073] "처치(Treatment)"는 장애의 발생을 저지하거나 또는 장애의 병리 또는 징후를 변경시키는 의도로 행해지는 중재다. 따라서, "처치"는 치료를 위한 처치와 예방 또는 방지를 위한 수단을 모두 지칭한다. 처치를 요구한 자들은 이미 장애를 가진 자들 뿐만 아니라 이 장애를 예방하고자 하는 자들이 포함된다. 종양 (가령, 암) 치료에서, 치료 물질은 종양 세포들의 병리를 직접적으로 감소시킬 수 있거나, 또는 종양 세포들이 다른 치료적 물질, 가령, 방사능 및/또는 화학요법에 의한 처치에 더 민감하게 만든다. 본 명세서에서 이용된 것과 같이, "호전된" 또는 "처치"(ameliorated or treatment)는 정상적인 값(예를 들면 건강한 환자 또는 개체에서 획득된 값)에 근접된 징후, 가령, 정상적인 값으로부터 50% 미만으로 차이가 나는, 바람직하게는 정상적인 값으로부터 약 25% 미만으로 차이가 나는, 더 바람직하게는, 정상적인 값으로부터 10% 미만으로 차이가 나는, 그리고 여전히 더 바람직하게는, 통상적인 통계학적 테스트를 이용하여 측정하였을 때 정상적인 값과 유의하게 상이하지 않는 징후를 지칭한다.

[0074] 따라서, 처치는 억제, 저해, 저지, 치료, 또는 이의 조합을 포함할 수 있다. 처치는 그 중에서도 특히 지속된 진행까지의 소요 시간 증가, 신속한 완화, 완화의 유도, 완화의 증대, 회복 가속화, 대체 치료에 대한 효과 증가 또는 저항 감소, 또는 이의 조합을 지칭한다. "억압" 또는 "저해"는 그 중에서도 특히 징후 개시의 지연, 질환 재발 방지, 재발 사건의 수 또는 빈도 감소, 징후적 사건 간의 잠복기 증가, 징후의 심각성 감소, 급성 사건의 심각성 감소, 징후의 수 감소, 질환-관련된 징후들 발생 감소, 징후들의 잠복기 감소, 징후들의 개선, 2차 징후들의 감소, 2차 감염의 감소, 환자 생존 연장, 또는 이의 조합을 포함한다. 이 징후들은 일차적이며, 또다른 구체예에서, 징후들은 이차적이다. "1차적(원발성)"이란 증식성 질환의 직접적 결과인 징후를 지칭하고, 한편 이차적이라는 것은 주요 원인으로부터 유도되거나, 또는 이에 수반되는 것을 말한다. 징후는 질환 또는 병리학적 상태의 임의의 현시일 수 있다.

[0075] "암 또는 종양 세포들의 처치"는 명세서를 통하여 설명된 다음중 하나 또는 그 이상의 효과를 유발시킬 수 있는 작은 분자 또는 핵산의 양을 말한다: (1) (i) 지체와 (ii) 완전한 성장 정지를 포함하는 종양 성장의 저해; (2) 종양 세포들의 수 감소; (3) 종양 크기 유지; (4) 종양 크기 감소; (5) 종양 세포가 주변 장기로의 침투의 (i)

감소, (ii) 지연 또는 (iii) 완전한 저지를 포함한 저해; (6) 전이의 (i) 감소, (ii) 지연 또는 (iii) 완전한 저지를 포함한 저해; (7) 항-종양 면역 반응의 강화, 이 결과로 (i) 종양 크기 유지, (ii) 종양 크기 감소, (iii) 종양 성장 지연, (iv) 감소, 지연 또는 침입의 저지가 일어날 수 있으며 및/또는 (8) 질환과 관련된 하나 또는 그 이상의 징후들의 심각성 또는 수를 어느 정도로의 완화.

[0076] 본 명세서에서 이용된 것과 같이, "징후의 호전" 또는 "징후의 치료"는 정상적인 값에 근접된 징후, 가령, 정상적인 값으로부터 50% 미만으로 차이가 나는, 바람직하게는 정상적인 값으로부터 약 25% 미만으로 차이가 나는, 더 바람직하게는, 정상적인 값으로부터 10% 미만으로 차이가 나는, 그리고 여전히 더 바람직하게는, 통상적인 통계학적 테스트를 이용하여 측정하였을 때 정상적인 값과 유의미하게 차이나지 않는 징후를 지칭한다.

[0077] 본 명세서에서 이용된 것과 같이, "약학적으로 수용가능한" 성분은 과도한 부작용(가령, 독성, 자극 및 알레르기 반응) 없이 합당한 유익/유해 비율로 균형이 잡힌 인간 및/또는 동물에 사용하기에 적합한 것이다.

[0078] 본 명세서에서 이용된 것과 같이, 용어 "안전한 그리고 효과적인 양" 또는 "치료량"이란 본 발명의 방식으로 이용되었을 때, 과도한 부작용(가령, 독성, 자극 및 알레르기 반응) 없이 합당한 유익/유해 비율로 균형이 잡힌 원하는 치료 반응을 얻는데 충분한 성분의 양을 지칭한다. "치료적으로 효과적인 양"은 원하는 치료적 반응을 얻는데 효과적인 본 발명의 화합물의 양을 의미한다. 예를 들면, 암의 성장을 지연 또는 암이 축소되도록 또는 전이를 예방하는데 효과적인 양이다. 특정한 안전하고 효과적인 양 또는 치료적으로 효과적인 양은 치료될 특정 질환, 환자의 신체적 상태, 치료될 포유류 또는 동물의 유형, 치료 기간, 현재 요법(존재한다면) 부분의 성질, 그리고 이용되는 특정 제형, 그리고 화합물 또는 이의 유도체의 구조와 같은 인자들에 따라 변화될 것이다.

[0079] 본 명세서에서 이용된 것과 같이, "암"은 포유류에서 볼 수 있는 백혈병, 임파종, 흑색종, 암종 및 육종을 포함하나 이에 한정되지 않는 모든 유형의 암 또는 신 생물 또는 악성 종양을 지칭한다. 암의 예로는 뇌암, 유방암, 췌장암, 경부암, 결장암, 두경부암, 신장암, 폐암, 비-소 세포 폐암, 흑색종, 중피종, 난소암, 육종, 위암, 자궁암 및 수아종을 포함한다. 추가적인 암은 예를 들면, 호지킨(Hodgkin) 질환, 비-호지킨(Non-Hodgkin) 임파종, 다발성 골수종, 신경아종, 유방암, 난소암, 폐암, 횡문근육종, 원발성 고혈소판증, 원발성 마크로글루블린혈증, 소(small)-세포 폐 종양, 원발성 뇌 종양, 위 암, 결장 암, 악성 췌장의 인슐린종, 악성 카르시노이드, 소변 방광 암, 전-악성 피부 병소, 고환암, 임파종, 갑상선암, 신경교종, 신경아종, 식도 암, 생식소변 기관 암, 악성 고갈습증, 경부암, 내막암, 부신 피질암, 그리고 전립선암을 포함한다.

[0080] "증식성 장애"는 정상 세포들보다 더 빨리 성장하는 세포, 이를 테면, 종양 세포들에 의해 야기되는 질환 또는 상태다. 증식성 장애는 양성 종양과 악성 종양을 포함한다. 종양의 구조로 분류할 경우, 증식성 장애는 충실성(solid) 종양과 조혈성 종양을 포함한다.

[0081] 용어 "환자", "대상" 또는 "개체"는 본 명세서에서 호환되며, 치료되는 포유류 대상을 지칭하는데, 인간 환자가 바람직하다. 일부 경우에서, 본 발명의 방법은 실험실 동물, 수의과적 용도, 그리고 가령, 마우스, 랫, 그리고 햄스터가 포함된 설치류 및 영장류의 질환용 동물 모델의 개발에 용도가 있다.

[0082] 본 명세서에서 이용된 것과 같이, 용어 "세포에 (가령, 발현 벡터, 핵산, 운반 비이클, 물질, 및 이와 유사한 것들)투여"는 이 분자를 세포에 형질도입, 형질감염, 현미주사, 일렉트로포레이팅(electroporating), 또는 슈팅하는 것을 말한다. 일부 측면들에 있어서, 분자들은 표적 세포에 전달 세포를 접촉시킴으로써 표적 세포 안으로 도입된다(가령, 전달 세포가 표적 세포에 근접해있을 때 세포 융합에 의해 또는 전달 세포의 용해에 의해).

[0083] **III. 추가 하우스키핑 유전자들**

[0084] 본 발명의 내용에 있어서 하우스키핑 유전자는 세포의 기본적인 기능 유지에 요구되는 임의의 유전자다. 무척추동물 뿐만 아니라 마우스에서 상당량의 유전적 상호작용 연구에 따르면 필수적인 세포의 많은 항시발현 기능은 하나의 상동체가 상실에 직면하면 세포를 생존할 수 있도록 만들지만, 다중 상동체가 상실시에는 완전하게 사멸되는 중복 기능을 인코딩하는 다중 상동성 유전자들(이를 테면, 중복 상동체들)에 의해 실행된다는 것을 알 수 있다 (Deutscher 외 2006; Costanzo 외 2010; Vavouri 외 2008; Brookfield 외 1997)

[0085] 본 발명의 방법에 유용한 예시적인 하우스키핑 유전자들과 이들의 중복 상동체는 표 1에서 설명된다. 하우스키핑 유전자들은 예를 들면, 엔돌라제 1 (EN01), 핵소오즈-6-포스페이트 데히드로게나제 (H6PD), 키네신 패밀리 구성원 1B (KIF1B), 니코틴아미드 뉴클레오티드 아데닐일 전이효소 1 (NMNAT1), 유비퀴틴화 인자 E4B (UBE4B), 아코니타제 1 (ACO1), 켈히-유사 9 (KLHL9), 판토테네이트 키나제 1 (PANK1), 그리고 키나제 패밀리 구성원 20B (KIF20B)을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

- [0086] 표 1은 무척추동물-기반된 아교모세포종에서 동형접합성 결실된 필수적이거나 중복로 존재하는 대사/하우스킵핑 유전자들의 보좌 목록이다. GBM-TCGA 데이터세트에서(log₂ 복사체 수 <-1) 동형접합성 결실된 유전자들의 완전한 목록으로 시작하여, 전술한 결실된 유전자가 필수 중복 하우스킵핑 유전자들인지를 결정하고, 그리고 궁극적으로 상동체의 약리학적 저해로 종양-특이적 세포의 절충된 기능을 야기하는 지를 판단하기 위하여 몇 가지 필터를 적용하였다. 결실된 유전자가 항시발현 기능을 하는지를 판단하기 위하여, 우리는 첫째로, 종양 조직과 정상적인 조직에서 발현 강도 및 패턴 뿐만 아니라 이 유전자의 전반적인 기능에 의문을 가졌다. 둘째로, 우리는 계통발생적으로 유전자가 어떻게 보존되었는지, 그리고 녹아웃 데이터가 무척추동물 모델에서 이용가능하였는지 여부에 질문하였다(Saccharomyces Genome Database (SGD), Wormbase (WB), Flybase (FB)). 세 번째로, 우리는 세포 생존 불능을 초래하는 공지의 유전적 상호작용이 무척추동물 또는 마우스에서 이미 기록되었는지를 질문하였다(데이터베이스 SGD, Wormbase, Flybase, MGI 이용). 네 번째, 우리는 한 상동체보다는 다른 상동체를 선택적으로 타격하기 위하여 변형되었을 수도 있는 작은 분자 저해제가 이용가능하였는 지를 질문하였다. 다섯 번째, 우리는 중복 가설을 테스트하기 위하여 결실된 유전자들을 가진 이용가능한 세포 계통에 대하여 조사하였다. 끝으로, 우리는 잠재적인 약물이 환자에 의해 얼마나 용인될지에 대한 생각을 얻기 위하여, MGI를 조사하여 약물-표적 상동체의 녹아웃이 유해한 지를 판단하였다. 이러한 분석으로부터 나타난 최강의 후보는 내림차순으로 다음과 같다: ENO1/ENO2; PANK1/PANK3, AC01/AC03 그리고 다소 정도가 덜한 것으로, KIF20B/KIF20A 쌍.
- [0087] 판토테네이트 키나제는 아세틸 전달 반응, 지방산 산화 그리고 지질 생합성의 필수 공인자인 코엔자임 A 생합성의 제 1 단계에 있다. 코엔자임 A는 유입될 수 없고, 반드시 세포 자주적인 방식으로 합성되어야 한다. 효모, 날파리 및 벌레는 이 효소의 오직 한 가지 이소폼만 있어서, 녹아웃은 치명적이므로(Zhou 외 2001), 이 유전자는 필수 유전자임을 말하는 것이다. 마우스와 인간에 있어서, PANK 활성을 인코딩하는 3가지 유전자들이 있는데, 가장 광범위하게 발현되는 것은 PANK1과 PANK3이다 (Leonardi 외 2010a; Leonardi 외 2010b). PANK1 또는 3중 하나의 녹아웃은 마우스를 생존할 수 있게 하는 반면, PANK1/3 이중 녹아웃 마우스는 아주 초기 배 발달동안에 치명적이다(S. Jackowski, St Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN, personal communications). PANK3에 대하여 일부 선호도를 보여주는 PANK의 저해제, 호판테네이트는 이미 존재하며, 인간에게 임상적으로 이용되어 왔었다(Zhang 2007). 따라서, PANK1 null 종양에서 PANK3의 저해 (호판테네이트의 유도체를 이용한)는 종양세포를 심각하게 손상시키지만, 정상 조직은 그대로 남겨두어야 한다(PANK3 null 마우스가 생존가능하며, 다소 정상임을 감안하면).
- [0088] 아코니타제 1 (ACO1)은 철 대사에서 필수적인 그러나 중복 역할을 하고, 시트르산염으로부터 이소시트레이트의 생성을 통하여 미토콘드리아 호흡의 연료 공급을 하는 이중 기능 효소다. ACO2는 철 대사를 조절하지는 못하지만, Krebs 사이클에서 시트르산염이 이소시트레이트로 전환을 담당하는 미토콘드리아 이소폼(isoform)이다. 효모에서, ACO1과 ACO2 단일 null 돌연변이체는 살아갈 수 있고, 이중 null은 죽게된다(Deutscher 외 2006). Aco2^{-/-} 마우스는 보고된 바 없지만, Aco1^{-/-}와 Aco3^{-/-} 마우스는 살아갈 수 있고, 번식도 가능하다. ACO3은 효소적으로 비활성이지만, ACO1과 유사하게 mRNA에서 IRE 결합을 통하여 철 대사를 조절한다. Aco1^{-/-} Aco3^{-/-} null 마우스는 대량 철 결핍 결과로 past E6.5를 견뎌낼 수 없다 (Smith 외 2006). 따라서, ACO1 동형접합성 결실로 종양은 두 가지 취약성에 노출된다: a) ACO2의 특이적 저해, 이 저해는 생물에너지와 지방산 생산에 연루된 시트레이트/이소시트레이트 전환의 불능으로 이어지고(Deutscher 외 2006) 그리고 b) ACO3/IREB2의 특이적 저해, 이는 철-결핍으로 이어진다(Smith 외 2006).
- [0089] KIF20B (M-단계 인단백질 1으로도 알려짐)는 세포질분열 (Abaza 외 2003) 부분의 완성에 요구되는 것으로 최초로 예상된 키네신 운동 효소다. 포유류에서 2개의 KIF20 패밀리 구성원이 있지만(KIF20A와 KIF20B), 효모에는 직접적인 1:1 상동체가 없다. C. 엘라간스(*C. elegans*)와 초파리(*Drosophila*)에서, KIF20의 한 가지 직접적인 1:1 상동체가 유전적 결실을 가진다면, 초기 유충에서 사멸이 초래되며(Moore 외 1994), 방대한 세포 사멸증거에서 포유류 상동체 KIF20A와 B는 중복적으로 작용할 수 있음이 제시된다. 실제로, KIF20B의 경우와 같이, KIF20A 또한 세포질분열에 필수적인 것으로 간주되었고(Hill 외 2000), 그리고 이들 모두 유사분열동안 매우 상향조절된다. 키네신들은 "약품이 될 만한(druggable)" 것으로 알려진 ATP-의존적 효소이며, 암 치료에서 연구되었다(Parrish 외 2007). KIF20A의 특이적 저해제인, 파프로트레인(Paprotain)이 최근에 설명되었다(Tcherniuk 외 2010). 더욱이, KIF20A는 체장 암에서 siRNA에 의해 "일반적인(general)" 암 약물 표적으로 연구되어왔다(Taniuchi 외 2005).
- [0090] ARS 유전자들은 필수이며, 그리고 (인간에서) 단백질 합성에 요구되는 비-중복 유전자들이다. 구체적으로, 이

들 유전자는 폴리펩티드 연쇄 연장을 위하여 리보솜에 의해 이용될 수 있는 아미노산-적재된 t-RNAs의 생산에 요구된다. 암 세포에서 이형접합성 비활성화될 수 있는 ARS 유전자들의 예로는 다음을 포함하나 이에 한정되지 않는다: TARS (5q13); EPARS (1q41); VARS (6p21); IARS (9q24); CARS (11p15); SARS (1p13); YARS (1p35); AARS (16q23); KARS (16q24); LARS (5q31); HARS (5q32); 그리고 RARS (5q35) (괄호안은 이들 유전자의 염색체 위치를 표시한다). 따라서, 일부 경우에서 구체예들에 따른 치료가능한 암 세포는 2개 또는 그 이상의 ARS 유전자들의 이형접합성 결실을 포함할 수 있다 (가령, SARS와 YARS; AARS와 KARS; 또는 LARS, HARS와 RARS).

[0091] 기타 적합한 하우스키핑 유전자들과 중복 상동체들은 당업자에 의해 용이하게 식별될 수 있다(가령, Nijhawan 외, 2012 참고, 이의 전문이 명세서의 참고자료에 포함된다).

[0092] **IV. 돌연변이들의 탐지**

[0093] 특정 구체예들은 생체내 또는 시료 안에서 유전자 가령 ENO1 또는 ARS의 한 개 복사체의 이형접합성 비활성화 탐지에 관련된다. 예를 들면, 일부 구체예들에서, 암 세포의 핵산 서열들에서 변화(돌연변이)를 탐지 또는 측정함으로써 비활성화가 탐지될 수 있다. 여전히 추가 측면들에서, 유전자 비활성화는 암 세포와 관련된 에놀라제 발현 감소 또는 에놀라제 활성 감소를 탐지함으로써 간접적으로 탐지된다.

[0094] **A. 핵산 탐지**

[0095] 일부 구체예들에서, 이형접합성 돌연변이 존재의 평가는 유전자 산물 (가령, ARS 또는 ENO1)을 인코딩하는 코딩 핵산, 가령 RNA 또는 DNA를 탐지 또는 정량화하는 것과 관련될 수 있다. 예를 들면, 일부 측면들에 있어서 암 세포 계능의 전부 또는 일부분이 시퀀싱되어, 유전자의 한 개 복사체 안에 돌연변이 (가령, 치환, 결실, 전도 또는 삽입) 부분의 존재여부가 탐지된다. 일부 측면들에 있어서, 중합효소 연쇄 반응 (PCR)을 이용하여 ENO1 또는 ARS 서열의 전부 또는 일부를 증폭시킬 수 있다.

[0096] 추가 구체예들에서, 유전자 코딩 서열내 돌연변이는 코딩 RNA의 전부 또는 일부의 서열을 결정함으로써 탐지될 수 있다. 예를 들면, 역전사 PCR을 이용하여 ENO1의 서열 또는 ARS 코딩 서열을 결정할 수 있다. 여전히 추가 측면들에 있어서 정량적 PCR 또는 RT PCR을 이용하여 세포가 감소된 양의 에놀라제 1 코딩 서열 (가령, 이 유전자의 하나의 복사체의 비활성화에 상응함)을 포함하는 지를 결정할 수 있다.

[0097] 일부 구체예들에서, 표준 서열 분석 기술을 이용한 특정 종류의 변이를 식별하기 위하여 상기에서 설명된 PCR 산물들은 서열 분석을 받게 될 수 있다. 특정 방법들 내에서, 유전자들의 포괄적인 분석은 최적의 시퀀싱을 위하여 기획된 프라이머 세트를 이용한 서열 분석에 의해 실행된다. 본 구체예들은 이용될 수 있는 모든 유형 또는 일부 유형의 분석이 이용되는 방법들을 제시한다. 인간 계능 (또는 이로부터 유도된 cDNA들) 부분의 공지 서열을 이용하여, ENO1 유전자 (또는 ARS 유전자) 전부와 주변 서열의 증폭이 허용되도록 올리고뉴클레오티드 프라이머들이 기획될 수 있다. 유사하게, 일부 경우들에 있어서, DNA 시퀀싱을 이용하여 에놀라제 1 코딩 핵산들을 탐지하거나 및/또는 정량화할 수 있다. 이러한 서열을 위한 방법들은 가역적 종결자 방법 (가령, Illumina 및 Helicos® BioSciences에 의해 이용되는), 파이로시퀀싱 (가령, 454 시퀀싱, Roche) 그리고 결찰에 의한 시퀀싱(가령, Life Technologies™ SOLiD™ 시퀀싱)을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0098] PCR™에서, 증폭된 표적 DNA 분자의 수는 일부 시약이 제한될 때까지 반응의 모든 사이클에서 2에 근접한 인수로 증가된다. 그 이후부터, 증폭 속도는 사이클 간에 증폭된 표적의 증가가 없을 때까지 점점 더 감소되기 시작한다. 사이클 수를 X축에 두고, 증폭된 표적 DNA의 log 농도를 Y 축으로 하는 그래프를 그리고, 표시된 점들을 연결하면 특징적인 모양의 곡선이 형성된다. 제 1 사이클에서 시작하여, 선의 기울기는 양성이며, 일정하다. 이것은 곡선에서 직선 부분에 해당된다. 시약이 제한되기 시작한 이후, 선의 기울기는 감소되기 시작하고, 결국 0이 된다. 이 점에서, 증폭된 표적 DNA의 농도는 일부 고정된 값에 근접하게 된다. 이것은 곡선에서 고원정체(plateau) 부분에 해당된다.

[0099] PCR™ 증폭의 직선 부분에서 표적 DNA 농도는 반응 시작전 표적의 출발 농도에 직접적으로 비례한다. 동일한 수의 사이클를 마친 PCR™ 반응들에서 직선 영역에 있는 표적 DNA의 증폭 산물의 농도를 측정함으로써, 원래 DNA 혼합물 안의 특이적 표적 서열의 상대적 농도를 결정하는 것이 가능하다. 따라서, 이들 방법을 이용하여 세포 안에서 이형접합성 결실된 ENO1 또는 ARS 서열이 탐지되거나 또는 에놀라제 1 코딩 서열의 발현이 전반적으로 감소됨이 탐지된다.

[0100] 일부 구체예들에서, 겔 분리와 에티디움 브로마이드로 착색 그리고 UV 광 아래에서 시각화에 의해 핵산들이 탐지되거나 또는 정량화된다. 일부 구체예들에서, 내부 방사능- 또는 형광적으로-라벨된 뉴클레오티드를 이용한 합성 또는 증폭(가령, PCR에 의한)으로 인한 핵산인 경우, 그 다음 이 산물들은 분리 이후 X-선 필름에 노출되

거나 적합한 자극 스펙트럼하에서 시각화될 수 있다.

[0101] 일부 구체예들에서, 시각화는 간접적으로 이루어진다. 핵산 분리후, 라벨된 핵산을 표적 서열과 접촉되도록 가져온다. 프로브는 발색단 또는 방사능동위원소라벨에 접합된다. 또다른 구체예에서, 프로브는 결합 짝, 가령 항체 또는 바이오틴에 접합되고, 그리고 결합 쌍의 다른 구성원은 탐지가능한 모이어티를 가지고 있다. 전술한 것의 한 가지 예가 미국 특허 제5,279,721호에 설명되며, 이의 전문이 명세서의 참고자료에 포함되는데, 이 특허에는 자동화된 전기영동 및 핵산 전달을 위한 장치와 방법이 공개되어 있다. 이 장치는 겔의 외부적 조작없이 전기영동과 블랏팅을 허용하고, 본 구체예들에 따른 방법들을 실행하는데 이상적이다.

[0102] 유전자내 돌연변이들은 혼성화 기술에 의해 더 평가될 수 있다. 예를 들면, 노던 블랏팅과 서든 블랏팅 기술은 당분야에 숙련자들에게 공지된 것들이다. 노던 블랏팅과 서든 블랏팅은 RNA 또는 DNA를 각각 표적으로 이용한다. 간단하게 설명하자면, 적합한 매트릭스, 대개 니트로셀룰로오즈 필터 상에 고정된 RNA 또는 DNA 종을 표적으로 하는데 프로브가 이용된다. 상이한 종들은 분석을 용이하게 하기 위하여 공간적으로 분리되어야만 한다. 공간적 분리는 핵산 종의 겔 전기영동에 이어서 필터에 블랏팅(blotting)함으로써 대개 이루어진다. 그 후에, 블랏팅된 표적은 변성 및 재혼성화를 촉진시키는 조건하에 프로브 (가령 라벨된 프로브)와 함께 향온처리된다. 프로브는 표적과 염기쌍을 이루도록 기획되었기 때문에, 프로브는 변성 조건하에서 표적 서열의 일부에 결합될 것이다. 그 다음 결합안된 프로브가 제거되고, 탐지가 실행된다. 유사하게, 라벨된 프로브는 ENO1 또는 ARS에서(또는 이의 하나의 복사체 없이) 이형접합성 돌연변이의 존재를 탐지하기 위하여 현장 혼성화에 이용될 수 있다. 예를 들면, 형광 현장 혼성화 (FISH)가 이용될 수 있다.

[0103] **B. 감소된 에놀라제 1 단백질 발현 또는 활성의 탐지**

[0104] 일부 측면들에 있어서, 구체예들의 방법들은 에놀라제 1 단백질의 발현 또는 활성 탐지에 관련된다. 예를 들면, 에놀라제 1 단백질의 결합, 정제, 제거, 정량화, 및/또는 전반적인 탐지하는 면역탐지 방법들이 이용될 수 있다. 본 구체예들에 따라 준비된 항체들은 대상 또는 시료, 가령, 종양 생검에서 에놀라제 1을 탐지 및/또는 정량화하는데 이용될 수 있다. 일부 면역탐지 방법들은 효소 연계된 면역흡착 분석 (ELISA), 방사능면역분석 (RIA), 면역방사능측정 분석, 플루오르면역분석, 화학적발광 분석, 생물발광 분석, 그리고 웨스턴 블랏 및 그 외다수를 포함한다. 유용한 다양한 면역탐지 방법들의 단계들이 과학 문헌, 예컨대, 가령, Doolittle MH and Ben-Zeev O, 1999; Gulbis B and Galand P, 1993; De Jager R 외, 1993; 그리고 Nakamura 외, 1987에서 설명되며, 이들 각 전문이 명세서의 참고자료에 포함된다.

[0105] **1. ELISAs**

[0106] 상기에서 상세하게 설명된 것과 같이, 가장 간단하고 및/또는 직접적인 의미에서 면역분석은 결합 분석이다. 특정 바람직한 면역분석은 당분야에 공지된 다양한 유형의 효소 연계된 면역흡착 분석 (ELISAs) 및/또는 방사능면역분석 (RIA)이다. 조직 단편을 이용한 면역조직화학 탐지 또한 특히 유용하다.

[0107] 일부 구체예들에서, 구체예들의 항-에놀라제 1 항체들은 단백질 친화력을 나타내는 선택된 표면, 가령 폴리스티렌 미량적정 플레이트 상의 웰에 고정된다. 그 다음, 단백질 항원을 보유하는 것으로 의심되는 테스트 조성물, 가령 임상적인 시료가 웰에 추가된다. 결합 및/또는 비-특이적으로 결합된 면역 복합체의 제거를 위한 세척 후, 결합된 단백질 항원이 탐지된다. 탐지가능한 라벨에 연계된 또다른 항-에놀라제 1 항체를 추가하여 탐지가 일반적으로 이루어진다. 이러한 유형의 ELISA는 단순 "샌드위치 ELISA"이다. 탐지 및 정량화는 제 2 항-에놀라제 1 항체 추가, 이어서 제 2 항체에 대한 결합 친화력을 보유하는 제 3 항체의 추가로 획득될 수 있는데, 이때 제 3 항체는 탐지가능한 라벨에 연계된다.

[0108] 일부 구체예들에서, 에놀라제 1 단백질 항원을 함유하는 것으로 의심되는 시료는 웰 표면에 고정되고 및/또는 구체예들의 항-에놀라제 1 항체들과 접촉된다. 결합후 및/또는 비-특이적으로 결합된 면역 복합체의 제거를 위한 세척 후, 결합된 항-에놀라제 1 항체들이 탐지되고 정량화된다. 최초 항- 에놀라제 1 항체들이 탐지가능한 라벨에 연계된 경우, 이 면역 복합체는 직접적으로 탐지될 수 있다. 다시, 제 1 항-에놀라제 1 항체에 대한 결합 친화력을 가진 제 2 항체를 이용하여 면역 복합체가 탐지될 수 있는데, 이때 제 2 항체는 탐지가능한 라벨에 연계된다.

[0109] 일부 구체예들에서, 에놀라제 1 단백질, 폴리펩티드들 및/또는 펩티드들이 고정된다. 일부 구체예들에서, ELISA는 탐지에서 항체 경쟁을 이용한다. ELISA에서, 에놀라제 1 항원에 대항하는 라벨된 항체들이 웰에 추가되고, 결합이 허용되고, 이들의 라벨에 의해 탐지된다. 미지의 시료 안에 있는 야생형 또는 돌연변이 에놀라제 1 항원의 양은 피복된 웰에서 향온처리 전 또는 향온처리하는 동안 시료에 항원에 대항하는 라벨된 항체들을 혼합하

여 측정된다. 시료 안에 에놀라제 1 항원이 존재하면, 웰에 결합하는데 이용가능한 야생형 또는 돌연변이 단백질의 양이 감소되고, 따라서 최종 신호가 감소된다. 이것은 미지의 시료 안에 에놀라제 1 항원에 대항하는 항체를 탐지할 경우에 또한 적합하며, 이때 라벨안된 항체는 항원-피복된 웰에 결합되고, 따라서 라벨된 항체들이 결합되는데 이용가능한 항원의 양이 감소된다.

[0110] 이용되는 형태와 무관하게, ELISA들은 공통적인 특징, 가령, 피복, 항온처리, 결합 그리고 비-특이적으로 결합된 종을 제거하기 위한 세척, 그리고 결합된 면역 복합체의 탐지를 포함한다. 이런 것들은 당업자에게 잘 알려진 것들이다.

[0111] **2. 면역조직화학**

[0112] 본 구체예들의 항-에놀라제 1 항체들은 면역조직화학(IHC)에 의한 연구용으로 준비된 새로-냉동된 그리고/또는 포르말린-고정된, 파라핀에 내장된 조직 블록과 병용하여 또한 이용될 수 있다. 이들 미립자 견본들로부터 조직 블록을 준비하는 방법들은 다양한 예후 인자들의 기존 IHC 연구에서 성공적으로 이용되었으며, 그리고/또는 당업자들에게 잘 알려져 있다(Brown 외, 1990; Abbondanzo 외, 1990; Allred 외, 1990).

[0113] 간략하게 설명하자면, 냉동된-단편들(가령, 맥관 조직 단편들)은 실온에서 작은 플라스틱 캡슐안의 인산염 완충된 염수(PBS)에 냉동된 분쇄된 조직 50ng을 재수화시키고; 미립자들을 원심분리에 의해 펠렛화시키고; 점성 내장된 매질(OCT)에 이들을 재현탁시키고; 캡슐을 역위시키고/시키거나 원심분리에 의해 다시 펠렛화시키고; 70°C 이소펜탄에서 순간-냉동시키고; 플라스틱 캡슐을 절단 및/또는 조직의 냉동된 원통을 제거하고; 저온유지장치 세단기(microtome) 척(chuck) 상에 조직 원통을 고정시키고; 그리고/또는 25-50개의 연속 절편을 절단함으로써 준비될 수 있다.

[0114] 영구-단편들은 플라스틱 마이크로튜브 안에 50mg 시료를 재수화시키고; 펠렛화하고; 4시간 고정을 위하여 10% 포르말린에 재현탁시키고; 세척/펠렛화시키고; 2.5%의 따뜻한 한천에 재현탁시키고; 펠렛화시키고; 얼음물에 냉각시켜 한천을 경화시키고; 튜브로부터 조직/한천 블록을 제거하고; 파라핀에 블록을 침투 및/또는 내장시키고; 그리고/또는 최대 50회 연속 영구 절편으로 절단하여 준비될 수 있다.

[0115] **3. 면역전자현미경**

[0116] 본 구체예들의 항체들은 세포내 조직 성분들을 식별하기 위하여 전자현미경과 병용되어 또한 이용될 수 있다. 간략하게 설명하자면, 전자-밀집된 라벨은 항-에놀라제 1 항체에 직접적으로 또는 간접적으로 접합된다. 구체예들에 따른 전자-밀집된 라벨의 예로는 페리틴과 금이 있다. 전자-밀집된 라벨은 전자들을 흡수하고, 전자 현미경에 의해 시작화될 수 있다.

[0117] **4. 면역탐지 키트**

[0118] 일부 측면들에 있어서, 본 구체예들은 상기에서 설명된 면역탐지 방법들과 함께 이용될 면역탐지 키트에 관련된 다. 항-에놀라제 1 항체들은 이러한 항원을 탐지하는데 일반적으로 이용되기 때문에, 항체들은 키트에 포함되는 것이 바람직할 것이다. 그러나, 이러한 성분을 모두 포함하는 키트가 제시될 수 있다. 따라서 면역탐지 키트의 적절한 용기 수단 안에는 단백질, 폴리펩티드 및/또는 펩티드에 결합되는 제 1 항체 (가령, 항-에놀라제 1 항체), 및/또는 임의선택적으로, 면역탐지 시약 및/또는 추가 임의선택적으로, 정제된 또는 재조합 단백질, 폴리펩티드 및/또는 펩티드가 포함될 수 있다.

[0119] 일부 구체예들에서, 단클론 항체들이 이용될 것이다. 특정 구체예들에서, 항원성 단백질, 폴리펩티드 및/또는 펩티드에 결합되는 제 1 항체는 고체 지지대, 가령 컬럼 매트릭스 및/또는 미량적정 플레이트의 웰에 사전-결합될 수 있다.

[0120] 키트의 면역탐지 시약들은 주어진 항체에 관련된 그리고/또는 연계된 탐지가능한 라벨이 포함된 다양한 형태중 임의의 것을 취할 수 있다. 2차 결합 리간드에 관련된 그리고/또는 부착된 탐지가능한 라벨들이 또한 고려된다. 예시적인 2차 리간드는 제 1 항체에 결합 친화력을 가지는 제 2 항체들이다.

[0121] 본 키트에 이용되는데 추가로 적합한 면역탐지 시약들은 제 1 항체에 대한 결합 친화력을 보유하는 제 2 항체와, 제 2 항체에 대한 결합 친화력을 보유하는 제 3 항체를 포함하는 두-성분 시약이 포함되며, 이때 제 3 항체는 탐지가능한 라벨에 연계된다. 상기에서 명시된 것과 같이, 다수의 예시적인 라벨이 당분야에 공지되어 있고, 이러한 모든 라벨은 본 구체예들과 연계되어 이용될 수 있다.

[0122] 본 구체예들에 따른 키트는 에놀라제 1 항원의 적절하게 분액된(aliquoted) 조성물을 더 포함할 수 있는데, 탐

지 분석을 위한 표준 곡선을 준비하는데 이용될 수 있도록 라벨되거나 또는 라벨되어 있지 않을 수 있다. 제공된 키트는 중간생성물의 형태로 완전하게 접합된 형태의 항체-라벨 접합체(conjugates)를 함유하거나, 그리고/또는 키트 사용자에게 의해 접합될 수 있도록 별개의 모이어티로 함유될 수 있다. 키트의 성분들은 수성 매질 안에 그리고/또는 동결건조된 형태로 포장될 수 있다.

[0123] 키트의 용기 수단은 일반적으로 최소한 한 가지 바이알, 테스트튜브, 플라스크, 병, 주사기 및/또는 기타 용기 수단을 포함하는데, 이 용기 안에 항체가 위치되며, 그리고/또는 바람직하게는, 항체가 적절하게 분액된다. 본 구체예들의 키트는 상업적 판매를 위하여 단힌 상태로 항체, 항원, 및/또는 임의의 다른 시약 용기들을 보유하는 수단을 일반적으로 포함할 것이다. 이러한 용기들은 주사기 및/또는 원하는 바이알이 용기 안에서 유지되도록 사출-성형된 플라스틱 용기를 포함할 수 있다.

[0124] **V. 저해제들**

[0125] 저해제는 필수 하우스키프 유전자의 중복 상동체의 발현 또는 활성을 감소시키는 화합물이다. 발현 또는 활성의 감소는 필수 하우스키프 유전자의 중복 상동체의 생물학적 기능의 감소로 특징된다. 저해제들은 당분야에 공지되어 있으며, 본 명세서에서 설명된 방법들을 이용하여 식별된다. 하우스키프 유전자 활성은 당분야에 공지된 방법들에 의해 측정된다.

[0126] 본 발명의 방법들에 유용한 예시적인 저해제들이 표 1에서 설명된다. 공지된 방법에 의해 당업자는 다른 적합한 저해제들도 용이하게 식별할 수 있다.

[0127] 예를 들면, 하우스키프 유전자가 에놀라제인 경우, 이 저해제는 포스포노아세토히드록사메이트이다. 하우스키프 유전자가 헥소오즈-6-포스페이트 데히드로게나제 (H6PD)이고 중복 상동체는 글루코오즈-6 데히드로게나제 (G6PD)인 경우, 이 저해제는 예를 들면, 데히드로에피안도스테론을 포함할 수 있다.

[0128] 하우스키프 유전자가 니코틴아미드 뉴클레오티드 아데닐일 전이효소 1 (NMNAT1)이고, 상기 중복 상동체가 니코틴아미드 뉴클레오티드 아데닐일 전이효소 2 (NMNAT2) 또는 니코틴아미드 뉴클레오티드 아데닐일 전이효소 3 (NMNAT3)인 경우, 이 저해제는 예를 들면; Np3AD, Np4As 그리고 Nap4AD이다. 하우스키프 유전자가 어코니트세 (aconitise) 1 (ACO1)이고 중복 상동체가 아코니타제 2 (ACO2) 또는 아코니타제 3(ACO3)인 경우, 이 저해제는 예를 들면, 플루오르시트레이트이다. 하우스키프 유전자는 판토테네이트 키나제 1 (PANK1)이고 중복 상동체는 판토테네이트 키나제 3 (PANK3)인 경우, 이 저해제는 예를 들면 호판테네이트이다.

[0129] **A. 당분해 저해제들**

[0130] 본 발명의 구체예들은 당분해 저해제들로 암 세포를 효과적으로 치료하는 것을 목표로 하는 조성물 및 방법들에 관계된다. 예를 들면, 당분해 저해제는 피루베이트 키나제 (가령, PKLR1 또는 PKM2), 에놀라제 (가령, ENO1, ENO2 또는 ENO3), 포스포글리세레이트 무타제 (가령, PGM1, PGM2, PGM2L1, PGM3 또는 PGM5), 포스포글리세레이트 키나제 (가령, PGK1 또는 PGK2), 글리세르알데히드 포스페이트 데히드로게나제 (GAPDH), 트리오스포스페이트 이소메라제 (TPI), 푸락토즈 바이포스페이트 알도라제 (가령, Aldoa, Aldob 또는 Aldoc), 포스포푸락토키나제 (PFK1), 포스포글루코오즈 이소메라제 (GPI) 또는 헥소키나제 (가령, HK1, HK2 또는 HK3) 부분의 저해제일 수 있다.

[0131] 일부 측면들에 있어서, 상기 당분해 저해제는 핵산 또는 폴리펩티드 저해제다. 예를 들면, 이 저해제는 당분해 효소, 가령 피루베이트 키나제, 에놀라제, 포스포글리세레이트 무타제, 포스포글리세레이트 키나제, GAPDH, TPI, 푸락토즈 바이포스페이트 알도라제, 포스포푸락토키나제, GPI 또는 헥소키나제에 결합하는 항체 또는 이의 단편일 수 있다. 추가 측면들에 있어서, 이 저해제는 당분해 효소를 인코딩하는 핵산 분자의 전부 또는 일부에 결합하는 저해성 핵산일 수 있다. 예를 들면, 이 저해성 핵산은 PKLR1 PKM2, ENO1, ENO2, ENO3, PGM1, PGM2, PGM2L1, PGM3, PGM5 PGK1, PGK2, GAPDH, TPI, Aldoa, Aldob, Aldoc, PFK1, GPI, HK1, HK2 또는 HK3을 인코딩하는 mRNA의 전부 또는 일부에 상보적인 RNA일 수 있다.

[0132] 추가 측면들에 있어서, 상기 당분해 저해제는 작은 분자 저해제 또는 이의 프로드럭이다. 예를 들면, 작은 분자 저해제는 피루베이트 키나제, 에놀라제, 포스포글리세레이트 무타제, 포스포글리세레이트 키나제, GAPDH, TPI, 푸락토즈 바이포스페이트 알도라제, 포스포푸락토키나제, GPI 또는 헥소키나제의 저해제일 수 있다. 예로써 당분해 저해제 화합물들은 2-데옥시글루코오즈, 6-아미노니코틴아미드, 테트로즈 디포스페이트, 코닝산과 MJE3을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 추가로, 예시적인 당분해 저해제들은 피루베이트에 관련된 조성물들을 포함한다. 예를 들면, 피루베이트 유도물질들은 미국 특허 출원 공개 US 2003/0013656, US 2003/0013847, US

2003/0013657, 및 US 2003/0013846에서 설명된다.

[0133] 일부 바람직한 측면들에 있어서, 상기 당분해 저해제는 에놀라제 저해제다. 이러한 에놀라제 저해제들의 예로는 D-타르트르네이트 세미알데히드 포스페이트; 3-아미노에놀피루베이트-2-포스페이트; 포스포노아세토히드록사메이트 (PhAH); 2-플루오르-2-포스포노아세토히드록사메이트; (3-히드록시-2-니트로프로필) 포스포네이트; (니트로에틸)포스포네이트; d-(포스포노에틸)니트로레이트, 플루오르화물 그리고 이의 프로드럭과 이의 유도체들을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0134] **B. ARS 저해제들**

[0135] 특정 구체예들에서, 본 발명은 하나 또는 그 이상의 ARS 유전자(들) 부분의 이형접합성 비활성화를 보유하는 암 치료에 사용되는 ARS 저해제들과 이의 투여 방법에 관련된다. 일부 측면들에 있어서, ARS 저해제는 진핵생물의 아미노아실 tRNA를 선호적으로 저해한다. 예를 들면, ARS 저해제는 프롤릴 tRNA 합성효소, 시스테이닐 tRNA 합성효소, 글리실 tRNA 합성효소, 알라닐 tRNA 합성효소, 아스파르틸 tRNA 합성효소, 글루타밀 tRNA 합성효소, 아스파라길 tRNA 합성효소, 글루타미닐 tRNA 합성효소, 세릴 tRNA 합성효소, 아르기닐 tRNA 합성효소, 히스티딜 tRNA 합성효소, 티로실 tRNA 합성효소, 또는 글루타밀-프롤릴-tRNA 합성효소 (가령, 할로푸기논)를 저해하는 물질일 수 있다. ARS 저해제들의 예로는 TARS 저해제, 보렐리딘, 뿐만 아니라 항-미생물 ARS 저해제들 (그리고 이의 유도체들) 가령 뮤피로신(Mupirocin); SB-234764; 인돌마이신(Indolmycin); AN-2690; CB-432; 이코핑기펜 (Icofungipen); REP8839; 시스펜타신(Cispentacin); 추양신마이신(Chuangxinmycin); 마이크로신(Microcin) C (또는 가공된 Microcin C); 포스미도신(Phosmidosin); 아스카미신(Ascarnycin); 아그로신(Agrocin); SB-217452; 또는 알보마이신(Albomycin)을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 본 구체예들의 방법에 이용될 수 있는 추가적인 저해제들은 미국 특허 공개 20120058133에서 제시되며, 명세서의 참고자료에 포함된다.

[0136] **C. 프로드럭(prodrugs)**

[0137] 본 발명의 화합물들은 프로드럭 형태로 또한 존재할 수 있다. 프로드럭은 약제의 다수의 바람직한 성질(가령, 용해도, 생체이용성, 제작 등)을 강화시키는 것으로 알려져 있기 때문에, 본 발명의 일부 방법에서 이용되는 화합물들은 원하는 경우, 프로드럭 형태로 전달될 수 있다. 일반적으로, 이러한 프로드럭은 구체예들의 당분해 저해제들의 기능적 유도체일 수 있고, 생체내에서 활성 당분해 저해제로 용이하게 전환된다. 적합한 프로드럭 유도체의 선택 및 제조에 적합한 통상적인 과정들은 예를 들면, Design of Prodrugs, ed. H. Bundgaard, Elsevier, 1985; Huttunen 외, 2011; 그리고 Hsieh 외, 2009에서 설명되며, 이의 전문이 명세서의 참고자료에 포함된다.

[0138] 프로드럭은 생물학적으로 활성을 가진 당분해 저해제의 약리적으로 비활성 유도체 (부모 약물 또는 부모 분자)이기 때문에 활성 약물을 방출시키기 위하여 신체내에서 변환이 필요하고, 부모 약물 분자보다 개선된 전달 성질을 보유한다. 생체내 변환은 예를 들면, 일부 대사 공정, 가령 카르복실, 포스포릴 또는 술페이트 에스테르의 화학적 또는 효소적 가수분해, 또는 민감성 기능기의 환원 또는 산화로 일어난 결과물이다. 따라서, 구체예들에서 이용되는 화합물들의 프로드럭은 화합물내 존재하는 기능기들을 변형시키고, 이러한 변형은 통상적인 조작에 의해 또는 생체내에서 절단되어 부모 화합물이 되는 방식으로 준비될 수 있다. 프로드럭은 예를 들면, 히드록시, 아미노, 또는 카르복시기가 임의의 기에 결합되어 있고, 프로드럭이 대상에게 투여되면, 각각 히드록시, 아미노, 또는 카르복실산을 형성하기 위하여 절단되는, 본 명세서에서 설명된 화합물들이 포함된다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 화합물들의 프로드럭 뿐만 아니라 프로드럭을 전달하는 방법들이 고려된다.

[0139] **VI. 복합 요법들**

[0140] 본 구체예들의 당분해 저해제 효과를 증대시키기 위하여, 암 치료에 효과적인 다른 물질들과 이들 조성물을 복합시키는 것이 바람직할 수 있다. 비-제한적인 실시예로써, 암 치료는 다른 항암 물질들과 함께 당분해 저해제로 실행될 수 있다. 항암 물질은 예를 들면, 암 세포들의 자가사멸(apoptosis)을 포함하는 암 세포들을 사멸, 암 세포들의 성장속도 감소, 전이 발생 감소 또는 전이 수의 감소, 종양 크기 감소, 종양 성장을 저해, 종양 또는 암 세포들에게 혈액 공급 감소, 암 세포들 또는 종양에 대항하는 면역 반응 촉진, 암 진행을 저지 또는 저해, 또는 암에 걸린 대상의 수명 연장에 의해, 대상의 암에게 부정적인 영향을 줄 수 있다. 좀더 일반적으로, 다른 조성물들은 이 세포를 죽이거나 또는 세포 증식을 저해시키는데 효과적인 복합 양으로 제공될 것이다. 이 세포에 단일 조성물 또는 두 물질을 포함하는 약리학적 제제를 접촉시켜(또는 대상에게 투여함으로써), 또는 이 세포에 두 가지 별도 조성물 또는 제제를 동시에 접촉시켜 이루어질 수 있는데, 이때 한 조성물은 당분해 저해제를 포함하며, 다른 조성물은 제 2 물질(들)을 포함한다.

[0141] 당분해 저해제를 이용한 처치는 다른 물질 또는 치료에 선행하여 또는 다른 물질 또는 치료 이후에 이루어지는 데, 이 두 치료의 간격은 몇 분 내지 몇 주의 시간 차를 둔다. 다른 물질과 당분해 저해제를 세포에 별도로 제공되는 구체예들에 있어서, 물질과 당분해 저해제가 이 세포에 유익한 복합 효과를 발휘할 수 있도록, 의미있는 시간 간격은 각 운반 시간 사이에 종료되지 않았음을 일반적으로 식별할 수 있다. 이러한 경우에서, 서로 약 12-24시간 범위, 더 바람직하게는 서로 약 6-12시간 안에 이들 둘을 이 세포에 접촉시킬 수 있다는 것이 고려된다. 일부 경우에서, 각 투여 사이에 몇 일(가령, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7 일) 내지 몇 주(가령, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8 주)가 경과되도록 치료 시간을 연장시키는 것이 바람직할 수 있다.

[0142] 다양한 조합들이 이용될 수 있는데, 이때 당분해 저해제 요법은 "A"이며, 2차 물질 또는 치료, 가령 방사능요법, 화학요법 또는 미토콘드리아 전자 운반 저해제는 "B"이다:

[0143] A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

[0144] B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

[0145] B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

[0146] 특정 구체예들에서, 본 구체예들의 당분해 저해제 요법의 처리는 저해제의 독성(존재한다면)을 고려하여, 화학요법 처리를 위한 일반적인 프로토콜을 따를 것이다. 치료 사이클은 필요에 따라 반복될 것으로 예측된다. 다양한 표준 요법들, 뿐만 아니라 외과적 중재는 전술된 과다증식성 세포 요법에 복합되어 적용될 수 있다는 점도 고려된다.

[0147] **A. 화학요법**

[0148] 암 요법들은 다양한 요법들을 또한 포함할 수 있다. 일부 측면들에 있어서, 구체예들의 당분해 저해제는 화학요법제와 병용되어 투여된다(또는 제형화된다). 복합 화학요법들은 예를 들면, 알킬화 물질 가령 티오테파와 사이클로포스파미드; 알킬 술폰에이트 가령, 부술판, 임프로술판과 피포술판; 아지리딘 가령 벤조도파, 카르보퀴온, 메투레도파와 우레도파; 알트레타민, 트리에틸렌아민, 트리에틸렌포스포라미드, 트리에틸렌티오포스포라미드 그리고 트리메틸로멜아민을 포함하는 이텔미민과 메틸라멜아민; 아세토게닌 (특히 불라타신과 불라타시논); 캄토세신 (합성 유사체 토포테칸 포함); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065 (아도젤레신, 카르젤레신과 바이젤레신 합성 유사체들을 포함); 크립토포신(특히 크립토포신 1 과 크립토포신 8); 도라스타틴; 듀오카르미신 (합성 유사체, KW-2189와 CB1-TM1을 포함); 엘루테로빈; 판크라티스타틴; 사르코딕틴; 스폰기스타틴; 나이트로젠 무스타드 가령, 클로람부칠, 클로르나파진, 클로로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로르에타민, 메클로르에타민 옥시드 하이드로클로라이드, 멜파란, 노벰비친, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 무스타드; 니트로조우레아 가령, 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 그리고 라니무스틴; 항생제 가령, 에네딘 항생제(가령, 칼리케아미신, 특히 칼리케아미신 감마I과 칼리케아미신 오메가 II; 디네마이신 A를 포함하는 디네마이신; 비스포스포네이트, 가령 클로드로네이트; 에스페라마이신; 뿐만 아니라 네오카르지노스타틴 발색단과 관련된 크로모프로테인 에네딘 항생제 발색단, 아클라시노미신, 악티노마이신, 아우트라리니신, 아자세린, 블레오마이신, 각티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 클로모미시니스, 닥티노마이신, 다우노루비친, 데토루비친, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비친 (모폴리노-독소루비친, 시아노모르폴리노-독소루비친, 2-피롤리노-독소루비친 그리고 데옥시독소루비친을 포함), 에피루비친, 에소루비친, 이다루비친, 마르첼로마이신, 미토마이신 가령, 미토마이신 C, 미코페놀산, 노갈라르미신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포르피로마이신, 퓨로마이신, 퀘엘라마이신, 로도루비친, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비친; 항-대사산물 가령 메토티렉세이트와 5-플루오르우라실(5-FU); 엽산 유사체들 가령, 데노프테린, 프레로프테린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체들 가령, 플루다라빈, 6-멸캄토퓨린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체들 가령, 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록스우리딘; 안드로겐 가령 칼루스테론, 드로모스타노론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토라톤; 항-부신, 가령 미토탄, 트리로스탄; 엽산 보충제, 가령 프로린산; 아세글락톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레불론산; 에닐루우라실; 암사크린; 베스트라부칠; 비산트렌; 에다트락세이트; 테포파미드; 데메폴신; 디아지퀴논; 엘포르미틴; 엘리프티니움 아세테이트; 에포티론; 에토글루시드; 갈륨 니트레이트; 히드록시우레아; 렌티난; 로니다이딘; 메이스타시노이드, 가령 메이탄신과 안사미토신; 미토구아존; 미토산트론; 모피단물; 니프라에린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비친; 로소산트론; 포도필린산; 2-에틸하이드라지드; 프로카르바진; PSK 폴리사카라이드 복합체; 라족산; 리조신; 시조피란;

스피로게르마니움; 테누아존산; 트리아지퀴논; 2,2',2"-트리클로로트리에틸아민; 트리코테센(특히 T-2 독신, 베라쿠린 A, 로리딘 A와 안구이딘); 우레탄; 벤데신; 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토락톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드("Ara-C"); 시클로포스파미드; 탁소이드, 가령, 파클리탁셀와 도세탁셀 겐시타빈; 6-티오구아닌; 멀캅도우레아; 플라티늄 배위 복합체, 가령 시스플라틴, 옥살리플라틴과 카르보플라틴; 빈블라스틴; 플라티늄; 에토포시드(VP-16); 이포스파미드; 미토산트론; 빈크리스틴; 비노렐빈; 노반트론; 테니포시드; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 셀로다; 이반드로네이트; 이리노테칸 (가령, CPT-11); 토포이소메라제 저해제 RFS 2000; 디플루오르메틸힐우로니틴(DMFO); 레티노이드, 가령 레티논산; 카페시타빈; 카르보플라틴, 프로카르바진, 플리코마이신, 겐시타비엔, 나벨빈, 파르네실-단백질 전이효소 저해제들, 트란스플라티늄, 그리고 상기 임의의 약학적으로 수용가능한 염, 산 또는 유도체들을 포함한다. 특정 구체예들에서, 본 명세서에서 제시된 조성물들은 게피티니브(gefitinib)와 복합되어 이용될 수 있다. 다른 구체예들에서, 본 구체예들은 Gleevac과 복합되어 실시될 수 있다 (가령, 일일 약 400 내지 약 800 mg의 Gleevac이 환자에게 투여될 수 있다). 특정 구체예들에서, 하나 또는 그 이상의 화학요법이 본 명세서에서 제시된 조성물들과 복합되어 이용될 수 있다.

[0149] **B. 방사선요법**

[0150] 암 요법으로 효과적이고 광범위하게 이용된 다른 인자들은 흔히 γ -선, X-선으로 알려진 것, 및/또는 중앙 세포들에게 지향된 방사능동위원소의 전달이 포함된다. 다른 형태의 DNA 손상 인자들이 또한 고려되는데, 예를 들면 가령 극초단파와 UV-조사(irradiation)가 된다. 이들 인자 모두 DNA, DNA 전구물질들, DNA의 복제와 복구, 그리고 염색체의 어셈블리와 유지에 광범위한 손상을 끼칠 것이다. X-선 투여량 범위는 일정 기간(3 내지 4주) 동안 일일 50 내지 200 켈트겐에서 2000 내지 6000 켈트겐의 단일 분량 범위다. 방사능동위원소의 투여 범위는 광범위하게 변화되는데, 동위원소의 반감기, 방출되는 방사능의 강도 및 유형, 그리고 신형성 세포들에 의한 흡수에 따라 달라진다.

[0151] 세포에 적용될 때 용어 "접촉된"과 "노출된"은 치료 조성물과 화학요법 또는 방사능치료적 물질을 표적 세포로 전달되는 또는 표적 세포와 나란하게 두는 과정을 설명하는 용어로 이용된다. 세포의 사멸 또는 성장정지(stasis)를 이루기 위하여, 이들 두 물질은 세포를 사멸 또는 분할을 중지시키는데 효과적인 복합된 양으로 세포로 전달된다.

[0152] **C. 면역요법**

[0153] 면역치료는 일반적으로 암 세포를 표적으로 하고, 암 세포를 파괴시키기 위하여 면역 효과물질 세포들과 분자들을 이용한다. 면역 효과물질은 예를 들면, 중앙 세포 표면상에 있는 일부 표식에 특이적인 항체다. 항체 단독으로 요법의 효과물질로 작용될 수 있으며, 또는 세포 사멸에 실질적으로 영향을 주는 다른 세포들을 모집할 수도 있다. 항체는 또한 약물 또는 독소(화학요법, 방사능핵종, 리친 A 연쇄, 콜레라 독소, 백일해 독소 등)에 접합되어, 단순히 표적화 물질로 작용될 수 있다. 대안으로, 효과물질은 중앙 세포 표적과 직접 또는 간접적으로 상호작용하는 표면 분자를 나르는 림프구일 수도 있다. 다양한 효과물질 세포들은 세포독성 T 세포들과 NK 세포들을 포함한다.

[0154] 따라서, 면역요법은 본 구체예들의 당분해 저해제 요법과 병용된 복합 요법의 일부로 이용될 수 있다. 복합된 요법에 적합한 전반적인 방법은 하기에서 논의된다. 일반적으로, 중앙 세포는 표적화에 순응하는 일부 표식, 이를 테면, 다른 세포 대부분에 존재하지 않는 표식들을 보유해야만 한다. 많은 중앙 표식이 존재하고, 이들중 임의의 것들이 본 구체예의 내용에서 표적화에 적합할 수 있다. 공통적인 중앙 표식은 암배아(carcinoembryonic) 항원, 전립선 특이적 항원, 소변 중앙 관련된 항원, 태아 항원, 티로시나제 (p97), gp68, TAG-72, HMGF, Sialyl Lewis Antigen, MucA, MucB, PLAP, 에스트로젠 수용체, 라미닌 수용체, *erb B* 그리고 p155를 포함한다.

[0155] **D. 유전자 요법**

[0156] 여전히 또다른 구체예에서, 2차 치료는 유전자 요법으로써, 치료 폴리뉴클레오티드는 치료 조성물과 동시에, 또는 치료 조성물 투여에 앞서, 또는 그 이후에 투여된다. 유전자 산물의 발현용 바이러스성 벡터는 당분야에 공지되어 있고, 그리고 진핵생물의 발현 시스템, 예를 들면 아데노바이러스, 아데노-관련된 바이러스, 레트로바이러스, 헤르피스바이러스, 렌티바이러스, 우두 바이러스가 포함된 폭스바이러스, 그리고 SV40가 포함된 파필로마 바이러스를 포함한다. 대안으로, 발현 구조체들의 투여는 지질 기반 벡터, 가령, 리포솜 또는 DOTAP:콜레스테롤 소낭으로 이루어질 수 있다. 이러한 모든 방법들은 당분야에 공지된 것들이다(가령 Sambrook 외, 1989;

Ausubel 외, 1998; Ausubel, 1996 참고).

[0157] 다음의 유전자 산물중 하나를 인코딩하는 벡터의 운반은 표적 조직에서 복합된 항-과다증식 효과를 가질 것이다. 본 구체예들 안에는 다양한 단백질이 포괄되는데, 이들중 일부는 하기에서 설명된다.

[0158] **1. 세포 증식 저해제들**

[0159] 상기에서 명시된 것과 같이, 종양 억제자 암유전자들은 과도한 세포의 증식을 저해하는 기능을 한다. 이들 유전자들의 비활성화로 인하여 이들의 저해성 활성을 파괴시켜, 통제불능의 증식이 일어난다.

[0160] 본 구체예들에 따른 2차 치료로 이용될 수 있는 유전자들은 p53, p16, Rb, APC, DCC, NF-1, NF-2, WT-1, MEN-I, MEN-II, zac1, p73, VHL, MMAC1/PTEN, DBCCR-1, FCC, rsk-3, p27, p27/p16 융합체, p21/p27 융합체, 항-혈전증 유전자들 (가령, COX-1, TFPI), PGS, Dp, E2F, ras, myc, neu, raf, erb, fms, trk, ret, gsp, hst, abl, E1A, p300, 혈관신생에 관련된 유전자들 (가령, VEGF, FGF, 트롬보스폰딘, BAI-1, GDAIF, 또는 이들의 수용체), MCC 그리고 표 4에 열거된 다른 유전자들을 포함한다.

[0161] **2. 예정된 세포 사멸의 조절자들**

[0162] 자가사멸(apoptosis), 또는 예정된 세포 사멸은 정상적인 배 발달, 성인 조직에서 항상성 유지, 그리고 발암 억제를 위한 필수 과정이다(Kerr 외, 1972). Bcl-2 단백질 패밀리와 ICE-유사 프로테아제들은 다른 시스템에서 자가사멸의 중요한 조절자들이며 효과물질들이라고 설명되었다. 여포 임과종과 관련된 것으로 발견된 Bcl-2 단백질은 다양한 자가사멸 자극에 반응하여 자가사멸을 조절하고 세포 생존을 강화시키는데 있어서 중요한 역할을 한다(Bakhshi 외, 1985; Cleary and Sklar, 1985; Cleary 외, 1986; Tsujimoto 외, 1985; Tsujimoto and Croce, 1986). 진화적으로 보존된 Bcl-2 단백질은 현재 사멸 항진제 또는 사멸 길항제들로 분류될 수 있는 관련된 단백질 패밀리의 구성원으로 인식된다.

[0163] 이러한 발견에 후속적으로, Bcl-2는 다양한 자극에 의해 촉발되는 세포 사멸을 억제하는 작용을 한다는 것이 밝혀졌다. 또한, 구조적 그리고 서열 상동체를 공유하는 Bcl-2 세포 사멸 조절 단백질 패밀리가 있는 것이 명백하다. 이러한 상이한 패밀리는 Bcl-2과 유사한 기능을 보유하거나(가령, Bcl_M, Bcl_W, Bcl_S, Mcl-1, A1, Bfl-1) 또는 Bcl-2 기능에 반작용으로 세포 사멸을 촉진시킨다는 것이 밝혀졌다(가령, Bax, Bak, Bik, Bim, Bid, Bad, Harakiri).

[0164] **E. 외과술**

[0165] 암 환자의 대략 60%는 예방적, 진단 또는 단계결정, 치료 및 완화목적이 포함된 일정 유형의 외과술을 받는다. 치유목적인 외과술은 다른 요법들, 가령 본 명세서에서 제시된 치료, 화학요법, 방사능요법, 호르몬 요법, 유전자 요법, 면역요법 및/또는 대체 요법들과 병용하여 이용되는 암 치료다.

[0166] 치료목적인 외과술은 암 조직의 전부 또는 일부를 물리적으로 제거, 잘라내거나 및/또는 파괴하는 절제를 포함한다. 종양 절제는 종양의 최소한 일부를 물리적으로 제거하는 것을 말한다. 종양 절제에 추가하여, 외과술에 의한 치료는 레이저 외과술, 냉동외과술, 전기외과술, 그리고 현미경으로 조작되는 외과술 (Mohs 외과술)을 포함한다. 본 구체예들은 겔으로 드러나는 암들, 전암들, 또는 정상적인 조직의 일부 부수적인 양의 제거와 함께 이용될 수 있다는 것이 추가 고려된다.

[0167] 모든 암 세포들, 조직, 또는 종양의 일부가 제거될 때, 신체내에 구멍이 형성될 수 있다. 추가적인 항암 요법과 함께 관류, 직접 주사 또는 국소 적용에 의해 처치가 이루어질 수 있다. 이러한 치료는 반복될 수 있는데, 예를 들면, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7일마다, 또는 1, 2, 3, 4, 5 주마다 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12 개월마다 반복될 수 있다. 이러한 치료에서 물론 투약량은 변화될 수 있다.

[0168] **F. 다른 물질들**

[0169] 치료 효과를 개선시키기 위하여 본 명세서에서 제시된 조성물과 복합하여 다른 물질들의 이용도 고려된다. 이들 추가적인 물질은 면역조절 물질들, 세포 표면 수용체와 GAP 접합(junctions) 부분의 상향 조절에 영향을 주는 물질들, 세포증식억제 그리고 분화 물질들, 세포 흡착 저해제들, 또는 자가사멸 유도물질에 대하여 과다증식성 세포들의 민감성을 증가시키는 물질들을 포함한다. 면역조절 물질들은 종양 괴사 인자; 인터페론 알파, 베타, 그리고 감마; IL-2와 다른 사이토킨들; F42K와 다른 사이토킨 유사체들; 또는 MIP-1, MIP-1베타, MCP-1, RANTES, 그리고 다른 케모킨들을 포함한다. 세포 표면 수용체들 또는 이들의 리간드들, 가령 Fas/Fas 리간드, DR4 또는 DR5/TRAIL의 상향조절은 과다증식성 세포들에서 자가분비 또는 측분비 효과를 확립함으로써 본 명세서

에서 제시된 조성물들의 자가사멸 유도 능력을 강화시킬 것으로 생각된다. GAP 접합 수를 상승시켜 세포내 신호 생성이 증가되면 이웃하는 과다증식성 세포 집단에서 항-과다증식 효과가 증가될 것이다. 다른 구체예들에서, 세포증식억제성 또는 분화 물질들은 치료의 항-과다증식 효과를 개선시키기 위하여 본 명세서에서 제공되는 조성물들과 복합 이용될 수 있다. 본 발명의 효과를 개선시키기 위하여 세포 흡착 저해제들도 고려된다. 세포 흡착 저해제들의 예로는 초점(focal) 흡착 키나제 (FAKs) 저해제들과 로바스타틴(Lovastatin)이 있다. 자가사멸에 대한 과다증식성 세포의 민감성을 증가시키는 다른 물질, 가령 항체 c225는 치료 효과를 개선시키기 위하여 본 명세서에서 제시되는 조성물과 복합 이용될 수 있다는 것도 추가 고려된다.

[0170] 특정 구체예들에 있어서, 호르몬 요법이 본 구체예들과 병용되어 또는 앞서 설명된 임의의 다른 암 요법과 복합되어 또한 이용될 수 있다. 호르몬은 특정 암들, 가령 유방암, 전립선암, 난소암, 또는 경부암의 치료에 이용되어, 특정 호르몬, 가령 테스토스테론 또는 에스트로겐의 수준을 낮추거나 또는 효과를 차단시킬 수 있다. 이 치료는 선택 치료로 최소한 하나의 다른 암요법과 복합되어 이용되거나 전이 위험을 감소시키는데 이용된다.

[0171] **VII. 치료 방법들**

[0172] 세포에 저해제가 함유된 조성물을 접촉시킴으로써 세포의 정상 성장이 저해, 가령 감소되거나 또는 세포 사멸이 유도된다. 세포 성장을 저해한다는 것은 조성물에 노출안된 세포들과 비교하였을 때, 세포가 더 낮은 속도로 증식되거나 또는 생존능이 감소됨을 말한다. 세포 성장은 당분야에 공지된 방법에 의해 측정되는데, 가령, 크리스탈 바이올렛, 트립판 블루 또는 ATP, NADH, Capases, LDH 또는 MTT의 측정에 의해 이루어진다.

[0173] 세포에 저해제를 직접적으로 접촉시킨다. 대안으로, 이 저해제는 전신으로 투여된다. 세포 증식을 감소(가령, 저해) 또는 세포 사멸을 유도하는데 충분한 양으로 저해제들이 투여된다.

[0174] 임의선택적으로, 이 세포는 화학요법 화합물과 접촉된다. 특히, 화학요법 화합물은 하우스키핑 유전자의 대사 경로를 표적으로 한다. 예를 들면, 화학요법치료 화합물은 DNA 항상성을 표적으로 한다. 예시적인 화학요법 화합물들은 겐시타빈을 포함한다.

[0175] 이 세포는 종양 세포, 가령 암종, 선종, 아세포종, 백혈병, 골수종, 또는 육종이다. 특히, 이 암은 아교모세포종이다.

[0176] 다양한 측면에서, 이 세포는 중복 상동체를 보유하는 하나 또는 그 이상의 하우스키핑 유전자들의 동형접합성 결실을 가진다. 동형접합성 결실은 당분야에 공지된 방법에 의해 식별된다.

[0177] 다양한 암의 징후들을 경감시키는데 이 방법들이 유용하다. 중복 상동체를 가진 하우스키핑 유전자에서 동형접합성 결실을 보유하는 임의의 암은 본 발명의 방법들에 따른 치료에 의해 개선된다. 일부 측면들에 있어서, 대상은 아교모세포종을 앓고 있다.

[0178] 치료가 임상적으로 유의하다면, 가령, 대상에서 종양 크기 감소, 종양의 유행의 감소 또는 종양의 전이 가능성의 감소로 이어진다면, 이 처치는 효과적이다. 치료가 예방용으로 제공되는 경우, "효과적인"(efficacious)는 종양의 형성을 지연 또는 저지시키거나, 종양의 임상적 징후를 저지 또는 경감시킨다는 의미다. 특정 종양 유형의 진단 또는 치료를 위한 임의의 공지된 방법과 연합되어 효과가 결정된다.

[0179] 본 발명에는 본 발명의 치료 방법에 따른 치료 효과를 결정하는 방법들이 또한 포함된다. 대상에서 얻은 시료 안에 하우스키핑 유전자의 대사경로에서 하나 또는 그 이상의 대사산물의 수준을 측정함으로써 치료 효과가 측정된다. 세포에서 경로를 중단시키면, 하우스키핑 유전자의 생산에 선행되는 대사산물의 축적으로 이어진다. 이러한 대사산물의 축적은 치료가 효과적임을 나타내는 것이다.

[0180] 예를 들면, 에놀라제 2의 저해시에, 세포에서 당분해 경로를 중단시키면, 에놀라제의 산물에 선행되는 대사산물, 즉, 2-포스포글리세레이트가 축적될 것이다. 효과적으로 처리된 종양은 이 대사산물을 에놀라제 저해 효과와 비례된 속도로 혈류에 방출할 것으로 예상된다. 이들 대사산물의 혈청 수준을 측정함으로써, 종양 표적 효과가 관찰될 수 있을 것이다. 특이적 저해제로 처리된 세포 계통의 대사 프로파일링을 실행하여 어떤 추가적인 대사산물이 축적되는지, 그리고 혈청 프로파일링 또는 추가 정제 처리에서 대부분 이용가능한지를 결정할 수 있다.

[0181] **VIII. 치료요법적 투여**

[0182] 본 발명은 저해제를 포함하는 조성물을 대상에게 투여하는 것을 포함한다.

[0183] 치료 화합물의 효과적인 양은 바람직하게는 약 0.1 mg/kg 내지 약 150 mg/kg이다. 당업자들이 인지할 수 있는

효과적인 투여분량은 투여 경로, 부형제의 사용, 그리고 암을 치료, 예방, 또는 징후의 완화를 위하여 다른 항-증식성 물질들 또는 치료적 물질들의 사용이 포함된 다른 치료용 처치와 공동투여에 따라 달라진다. 치료 레지멘은 표준 방법들을 이용하여 필수 하우스킵핑 유전자의 동형접합성 결실을 보유하는 암을 앓고 있는 포유류, 가령, 인간 환자를 식별함으로써 실시된다.

[0184] 약학 화합물은 당분야에 공지된 방법을 이용하여 이러한 개체에게 투여된다. 바람직하게는, 이 화합물은 경구, 직장, 비강, 국소, 또는 장관외, 가령, 피하, 복막내, 근육내, 그리고 정맥안으로 투여된다. 이 저해제들은 임의선택적으로 암을 치료하기 위한 치료 약물의 각테일 성분으로 제형화된다. 장관외 투여용으로 적합한 제형의 예로는 등장성 염 용액, 5% 글루코오스 용액 또는 또다른 약학적으로 수용가능한 표준 부형제 안에 활성 물질의 수성 용액을 포함한다. 표준 가용화 물질들, 가령 PVP 또는 사이클로텍스트린이 치료 화합물들의 운반을 위한 약학 부형제로 또한 이용된다.

[0185] 본 명세서에서 설명된 치료 화합물들은 통상적인 방법을 이용한 다른 투여 경로에 적합한 조성물로 제형화된다. 예를 들면, 치료 화합물들은 경구 투여용 캡슐 또는 정제로 제형화된다. 캡슐은 임의의 약학적으로 수용가능한 표준 재료, 가령 젤라틴 또는 셀룰로오스를 함유할 수 있다. 정제는 치료 화합물을 고형 운반체와 운반체의 혼합물에 압착함으로써 통상적인 과정에 따라 제형화될 수 있다. 고형 운반체의 예로는 전분과 당 벤토나이트가 포함된다. 화합물은 결합제, 가령 락토즈 또는 만니톨, 통상적인 충전제 및 정제화 물질을 함유하는 경질 껍질 정제 또는 캡슐 형태로 투여된다. 다른 제형에는 연고, 좌약, 페이스트, 스프레이, 크림, 젤, 재흡수성 스폰지 또는 포말이 포함된다. 이러한 제형은 당분야에 공지된 방법을 이용하여 만들어진다.

[0186] 치료 화합물들은 병든 조직에 화합물을 직접 접촉시킬 때 효과적이다. 따라서, 이 화합물은 국소적으로 투여된다. 대안으로, 치료 화합물들은 전신으로 투여된다. 예를 들면, 화합물들은 흡입에 의해 투여된다. 화합물들은 적합한 추진체, 가령, 이산화탄소와 같은 가스가 포함된 가압 용기 또는 분배기, 또는 분무기로부터 에어로졸 스프레이 형태로 운반된다.

[0187] 추가로, 화합물들은 대상의 인접 또는 주변 조직에 화합물을 서서히 방출하는 고형 또는 재흡수가능한 매트릭스를 이식(장기에 직접 이식 또는 피하로 이식)에 의해 투여될 수 있다.

[0188] **IX. 실시예들**

[0189] 다음의 실시예들은 본 발명의 바람직한 구체예들을 설명하기 위하여 포함된다. 다음의 실시예에 공개된 기술은 발명자들이 본 발명의 실시예에 있어서 잘 발휘되는 것으로 식별한 기술을 나타내며, 따라서 본 발명의 실시를 위한 바람직한 형태로 구성되어 있다는 것을 인지해야 한다. 그러나, 당업자는 본 공개내용에 비추어 본 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않고 특정 구체예에 많은 변화를 만들 수 있으며, 유사한 또는 비슷한 결과를 얻을 수 있음을 인지할 것이다.

[0190] **실시예 1 - 동형접합성 결실을 가진 암 세포에서 하우스킵핑 유전자들을 표적화는 암 세포를 사멸시킨다.**

[0191] 암은 하우스킵핑 유전자에서 동형접합성 결실을 보유하고, 하우스킵핑 유전자는 기능적 중복 상동체를 보유하는 경우, 중복 상동체의 활성을 저해하는데 충분한 양의 중복 상동체 저해제를 대상에게 투여 또는 세포에 접촉시킴으로써, 암 세포 증식 및/또는 사멸이 유도된다.

[0192] **전반적인 방법**

[0193] **세포 배양**

[0194] 동종접합성 결실을 가진 세포 계통은 공지의 방법으로 배양된다(1p36). 비교목적으로, 세포 계통 U87, LN319, SW1088, U343, U373과 A1207은 동일한 조건하에서 성장된다.

[0195] 하우스킵핑 유전자 발현의 *shRNA* 녹다운

[0196] 하우스킵핑 유전자를 표적으로 하는 헤어핀을 만들고, 하우스킵핑 유전자의 단백질 수준을 감소시키는 능력에 대해 선별된다.

[0197] GIPZ 벡터내 헤어핀은 제조업자가 제공하는 프로토콜을 이용하여 TRIPZ 벡터에 클론되었다. TRIPZ 벡터는 데옥시사이클린 유도시에만 발현되는 붉은 형광 단백질 리포터를 가진 데옥시사이클린 유도성 시스템이다. 재조합 렌티바이러스는 표준 프로토콜에 따라 293T 세포의 일시적 형질감염에 의해 만들어진다. 간략하게 설명하자면, 72 μg 의 *shRNA* 플라스미드, 54 μg 의 Delta 8.9 그리고 18 μg 의 VSVG 플라스미드는 Fugene® (Roche, Indianapolis, IN)를 이용하여 245 mm² 접시에 도말된 293T 세포에 형질감염된다. 바이러스성 상청액은 형질감

염 이후 72시간에 수거되며, 23,000 rpm에서 원심분리에 의해 농축되고, 그리고 세포 성장 배지에 재현탁된다. 형질유도를 위하여, 바이러스 용액은 4 µg/mL 폴리브렌이 함유된 세포 배양 배지에 추가되며; 48시간 후, 2 µg/mL 퓨로마이신을 이용하여 감염 세포들이 선택되며, 웨스턴 블랏으로 하우스키팅 유전자 녹다운에 대하여 테스트된다.

[0198] *shRNA 저항성 하우스키팅 유전자 구조체의 생성*

[0199] 세포에서 하우스키팅 유전자의 녹킹(knocking) 표현형 효과의 구체는 하우스키팅 유전자의 shRNA-저항성 형태를 과다발현시켜 실행된다. 간략하게 설명하자면, QuickChange Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA)에 따라 부위-지향된 돌연변이생성을 이용하여 shRNA의 표적이 되는 하우스키팅 유전자 코딩 영역으로 6개의 침묵 돌연변이들이 도입된다. shRNA-저항성 하우스키팅 유전자 코딩 영역은 pHAGE-CMV 렌티바이러스 벡터 안에 클론되고, 그리고 테옥시사이클린 존재 또는 부재하에 shRNA를 가진 세포 계통에서 과다발현된다. 대조군으로, GFP 유전자를 가진 렌티바이러스 벡터에 의해 동일한 세포 계통이 감염된다.

[0200] *증식 분석*

[0201] shRNA 또는 PhAH 처리된 세포 계통의 세포 성장은 크리스탈 바이올렛 착색을 통하여 또는 Promega Cell Titer Glo® 증식 키트(Roche, Indianapolis, IN)를 이용하여 분석된다. 크리스탈 바이올렛 분석의 경우, 각 시점에 6-웰 플레이트에 10,000개의 세포들이 접종된다. 표시된 시점에서, 세포들은 10% 포르말린에 고정되고, 1시간 동안 크리스탈 바이올렛 용액으로 착색된다. 10% 아세트산 용액을 이용하여 염료 추출이 실행되고, 590 nm에서 흡수도를 판독하였다. Cell titer Glo® 실험은 제조업자의 지시에 따라 실행된다. 각 시점에서 96 웰 플레이트에 웰당 1000개의 세포들이 도말되고, 매 24시간마다 형광 판독이 실시된다. 모든 실험은 3회 반복된다.

[0202] *하우스키팅 유전자 활성 분석*

[0203] 당분야에 공지된 방법을 이용하여 하우스키팅 유전자의 활성이 측정된다.

[0204] *웨스턴 블랏*

[0205] 2회 PBS 세척 후, 세포들은 약하게 흔들리면서 RIPA 완충액에서 15분 동안 배양된다. 그 다음 용해물이 수거되고, 초음파파쇄되고, 4°C에서 10분간 14000 RPM에서 원심분리된다. SDS-PAGE와 웨스턴 블랏은 전술한 것과 같이 실시된다(Maser 외, 2007).

[0206] **실시예 2 - ENO2 활성의 저해는 ENO1의 동형접합성 결실을 가진 세포 계통에서 세포 사멸을 유도한다**

[0207] **전반적인 방법**

[0208] *세포 배양*

[0209] 세포 계통 D423-MG (1p36 ENO1을 포함하는 동형접합성 결실됨)와 D502-MG (1p36 동형접합성으로 결실됨, 단, ENO1 제외)를 획득하였고, 20% FBS가 포함된 DMEM 배지에서 배양되었다(Duncan 외, 2010; D423과 D502는 Duncan 외에서 H423과 H502로 지칭되지만, Sanger 데이터베이스에서 D423-MG와 D502-MG로 언급되며, 본 명세서에서 명명법으로 채택됨). 비교 목적으로, 세포 계통 U87, LN319, SW1088, U343, U373과 A1207은 동일 조건에서 성장되었다. ScienCell (Carlsbad, CA)에서 획득한 정상적인 배아 인간 성상세포들은 제조업자가 제공한 배지에서 성장되었다.

[0210] *ENO2 발현의 shRNA 녹다운*

[0211] 에놀라제 2를 표적으로 하는 22개 헤어핀이 선별되었고, 4개의 독립적인 헤어핀들이 >50%의 단백질 수준으로 감소시키는 것으로 식별되었다. 이들중 2개 헤어핀(ShENO2-1과 shENO2-2)은 pLK0.1 벡터에 있고, 나머지 두 개는 발현 Arrest GIPZ (shENO2-3)와 TRIPZ (shENO2-4) shRNAmir 벡터 (Open Biosystems, Huntsville, AL)에 있다. GIPZ 벡터 안의 헤어핀은 제조업자가 제시하는 프로토콜을 이용하여 TRIPZ 벡터에 클론되었다. TRIPZ 벡터는 테옥시사이클린 유도시에만 발현되는 레드 형광 단백질 리포터를 가진 테옥시사이클린 유도성 시스템이다. 재조합 렌티바이러스는 표준 프로토콜에 따라 293T 세포들의 일시적 형질감염에 의해 생산된다. 간략하게 설명하자면, 72 µg의 shRNA 플라스미드, 54 µg의 Delta 8.9 플라스미드 그리고 18 µg의 VSVG 플라스미드는 Fugene® (Roche, Indianapolis, IN)를 이용하여 245 mm접시에 도말된 293T 세포에 형질감염된다. 바이러스성 상층액은 형질감염 이후 72시간에 수거되며, 23,000 rpm에서 원심분리에 의해 농축되고, 그리고 세포 성장 배지에 재현탁된다. 형질유도를 위하여, 바이러스 용액은 4 µg/mL 폴리브렌이 함유된 세포 배양 배지에 추가되며; 48시간 후, 2 µg/mL 퓨로마이신을 이용하여 감염 세포들이 선택되며, 웨스턴 블랏으로 ENO2 녹다운에 대하여 테스트된다

다.

[0212] *shRNA 저항성 ENO2 구조체의 생성*

[0213] 세포주 D423-MG에서 ENO2의 녹킹(knocking) 표현형 효과의 구체는 ENO2의 shRNA-저항성 형태를 과다발현시켜 실행된다. 간략하게 설명하자면, QuickChange Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA)에 따라 부위-지향된 돌연변이생성을 이용하여 shENO2-4의 표적이 되는 ENO2 코딩 영역으로 6개의 침묵 돌연변이들이 도입된다. shRNA-저항성 ENO2 코딩 영역은 pHAGE-CMV 렌티바이러스 벡터 안에 클론되고, 그리고 테옥시사이클린 존재 또는 부재하에 shENO2-4를 가진 D423-MG 계통에서 과다발현된다. 대조군으로, GFP 유전자를 가진 렌티바이러스 벡터에 의해 동일한 세포 계통이 감염된다.

[0214] *증식 분석*

[0215] shRNA 또는 PhAH 처리된 세포 계통의 세포 성장은 크리스탈 바이올렛 착색을 통하여 또는 Promega Cell Titer Glo® 증식 키트(Roche, Indianapolis, IN)를 이용하여 분석된다. 크리스탈 바이올렛 분석의 경우, 각 시점에 6-웰 플레이트에 10,000개의 세포들이 접종된다. 표시된 시점에서, 세포들은 10% 포르말린에 고정되고, 1시간 동안 크리스탈 바이올렛 용액으로 착색된다. 10% 아세트산 용액을 이용하여 염료 추출이 실행되고, 590 nm에서 흡수도를 판독하였다. Cell titer Glo® 실험은 제조업자의 지시에 따라 실행된다. 각 시점에서 96 웰 플레이트에 웰당 1000개의 세포들이 도말되고, 매 24시간마다 형광 판독이 실시된다. 모든 실험은 3회 반복된다.

[0216] *연질 한천 콜로니 형성 분석*

[0217] 앵커리지-독립적인 성장 분석은 6-웰 플레이트에서 이중 또는 삼중으로 실행되었다. 웰당 10^4 의 지정된 세포를 1% 저-용점 아가로즈 DMEM + 10% FBS를 함유하는 바닥 한천 상단에 0.4% 저-용점 아가로즈를 함유하는 DMEM + 10% FBS에 접종시켰다. 14 - 21 일 후, 콜로니는 요오드니트로테트라졸리늄클로라이드(Sigma-Aldrich)로 착색되고, 카운트되었다.

[0218] *정위(orthotopic) 종양생성 분석*

[0219] D423-MG 세포들의 주사는 이미 설명된 것과 같이 실행되었다(in Zheng 외, 2008). 6-12주령의 SCID 마우스(Charles River)는 Z 축(Stoelting)이 구비된 정위(stereotactic) 장치 안에 두었다. 두개골 앞 0.5 mm와 전정에서 측면 3.0 mm에 치과용 드릴을 이용하여 구멍을 뚫었다. Hanks 완충된 염 용액 안의 10만개 세포를 사면이 없는 30가우지 바늘이 있는 10- μ l Hamilton 주사기를 이용하여 뇌의 표면 아래 3mm 우측 꼬리핵(caudate nucleus)으로 주사하였다. 두피는 9-mm Autoclip Applier를 이용하여 단았다. 신경성 결손의 발생에 대해 동물들을 매일 지켜보았다.

[0220] 신경성 결손의 발생에 대해 동물들을 매일 지켜보았다. 모든 마우스 실험은 Harvard and Dana-Farber Cancer Institute Institutional Animal Care and Use Committee의 승인하에 실시되었다.

[0221] *에놀라제 활성 분석*

[0222] Joseph 외, 1996에서 이미 설명된 것과 같이, 피루베이트 키나제-젯산염 테히드로게나제 연결된 분석에서 NADH 산화 이후에 에놀라제 활성이 측정되었다. 간략하게 설명하자면, 세포들은 20 mM Tris HCL, 1 mM EDTA 그리고 1mM 베타-말캅토에탄올 pH 7.4에 용해되었고, 10초간 3회씩 폴리트론 균질화기를 이용하여 균질화된 후, 초음파 파쇄되었다. 340 nm에서의 흡수에 의해 광학적으로 또는 340nm에서 여기되고, 460nm에서 방출되는 형광에 의해 NADH 산화를 측정함으로써, 에놀라제 활성은 기록되었다.

[0223] *웨스턴 블랏*

[0224] 2회 PBS 세척 후, 세포들은 약하게 흔들리면서 RIPA 완충액에서 15분 동안 배양된다. 그 다음 용해물이 수거되고, 초음파파쇄되고, 4°C에서 10분간 14000 RPM에서 원심분리된다. SDS-PAGE와 웨스턴 블랏은 전술한 것과 같이 실시된다(Maser 외, 2007). 다음의 항체들이 이용되었다: Cell signaling Technologies (Danvers, MA) 부분의 에놀라제 1 CST#3810; 에놀라제 2 #9536; GAPDH CST# 3683 그리고 Sigma-Aldrich (St Louis, MO) 부분의 빈쿨린(Vinculin).

[0225] *저해제 연구*

[0226] 포스포노아세트히드록사메이트 리튬 염(PhAH)은 Anderson 외, 1984의 프로토콜에 따라 TCRS LLC (Bristol, PA)에 의해 맞춤 합성되었다. NMR에 의해 구조 및 순도는 실증되었다. PhAH는 PBS에 50mM 비축액으로 용해되고,

사용할 때까지 -80°C에서 냉동보관되었다. 화합물의 불안정성을 고려하여, 배지는 매 5일 마다 교체되었으며, 새로운 저해제가 새로운 배지에 추가되었다. 라파마이신, 소라페니브, 라파티니브 그리고 PHA665752는 각각 LC Labs (Woburn, MA) 그리고 Tocris (Ellisville, MO)에서 구하였다.

[0227] **결과**

[0228] TCGA Agilent SNP 어레이 데이터와 Affymetrix 어레이 CGH 데이터 데이터베이스(The Cancer Genome Atlas Research Network, 2008) 부분의 분석에서 ENO1의 동형접합성 결실을 가진 5/359 GBM 시료가 드러났고; 다른 게놈 데이터세트는 최대 5% 16,19,20 부분의 ENO1 동형접합성 결실 빈도를 나타낸다. 유전자 발현 분석에서 이들 시료 안에 에놀라제 1 발현의 발현은 거의 완전하게 없음이 나타난다(도 1b, 도 18). GBM 세포 계통, D423-MG20은 CAMTA1, VAMP3, PER3, UTS2, TNFRSF9, PARK7, ERFF11, SLC45A1, RERE, ENO1, CA6, SLC2A5, GPR157, MIR34A, H6PD, SPSB1, 그리고 SLC25A33 유전자들에 걸친 1p36.23 동형접합성 결실을 가지는 것으로 식별되었다. 제 2 GBM 세포 계통, D502-MG는 이 좌의 동형접합성 결실이 일어나지만, 고유한 ENO1 내지 SLC25A33 유전자들은 남겨둔다 (도 1c). 이들 계통의 웨스턴 블랏 분석에서 D423-MG은 에놀라제 1 단백질의 상실과 에놀라제 2의 정상적인 발현을 보여주고, D502-MG와 테스트된 모든 다른 교의/신경교종 세포 계통에서는 이들 두 단백질이 존재하는 것으로 나타난다(도 1d).

[0229] 다른 ENO1 고유의 대조군을 함께 가진 (U87, A1207, LN319) 이들 두 세포 계통은 야생형 또는 null ENO1 배경에서 에놀라제 2의 shRNA-매개된 녹다운의 충격을 평가하는데 이용되었다. 데옥시사이클린-유도성 시스템을 이용하여, 2개의 독립적인 shRNA가 에놀라제 2 단백질의 >70% 감소에 효과적이며(도 2a) 그리고 에놀라제 1 수준에 있어서는 영향이 없음을 보여준다. ENO2의 제거로 ENO1 null D423-MG에서만 세포 증식이 상당히 저해되었다(도 2b). 비-유도성 시스템에서 2개의 추가 독립적인 에놀라제 shRNA를 이용하였을 때 동일한 결과가 획득되었다(도 5). 헤어핀 저항성 ENO2 구조체의 발현은 shENO2 헤어핀의 유해한 효과를 완전히 역전시키고(도 7), 이것은 헤어핀의 효과가 ENO2 발현의 하향 조절에 특이적이었음을 나타낸다.

[0230] 그 다음, ENO1 야생형과 null 세포들에서 에놀라제 활성 저해의 약리학적 충격을 평가하였다. 기존 연구는 특히 항균 및 항기생충에 대한 에놀라제의 약리학적 저해에 중점되었고(Guha-Chowdhury 외, 1997; de, A. S. N. M. V. 외, 2007) 그리고 많은 화합물들이 특정화되었는데, 대부분은 반응 중간생성물 유사체로 작용한다 (표 4). 가장 강력한 에놀라제 저해제는 화합물 포스포노아세토히드록사메이트 (PhAH; Anderson 외, 1984)이며, 15 μM의 저해 상수를 가진 전이 상태 유사체로 작용하는 것으로 본다. PhAH는 인간 에놀라제에 테스트되지는 않았지만, 기존 작업에서 관련이 먼 유기체의 에놀라제에 대한 저해성 효과가 설명되었고(Anderson 외, 1984; de, A. S. N. M. V. 외, 2007), 이는 넓은 범위의 계통발생적 거리에 걸쳐서 이의 잠재적 용도를 암시하는 것이다. PhAH는 시험관내 신경교종 세포 계통의 고유 용해물에서 에놀라제를 강력하게 저해하였다(도 3b). 0.625 내지 50 μM 범위의 농도로 PhAH를 이용하면, ENO1 null 세포들에서 상당한 독성이 관찰되었고 (도 3a, c, d) ENO1 null 세포들과 비교하였을 때 에놀라제 활성이 최소한 10-배 더 큰 ENO1 고유 대조군에는 미미한 충격을 주었다 (도 3b; ENO1은 GBM에서 주요 에놀라제 이소폼이며, 세포의 에놀라제 활성의 75 내지 90%를 차지한다; Joseph 외, 1996). 특히, ENO1 null 세포들은 다른 분자 표적이 된 요법들, 가령 수용체 티로신 키나제 저해제들(라파티니브, 소라페니브, PHA665752)에 대해 더 큰 민감성을 나타내지 않는다(Stommel 외, 2007)(도 10). 이들 데이터에서 D423-MG 세포들은 다른 항암 물질들에 대하여 광범위하게 민감하지 않으며, 그리고 PhAH는 ENO1 null GBM 세포들을 선택적으로 표적한다는 것이 나타난다. 1p36의 동형접합성 결실을 가지나, 여전히 ENO1 유전자를 유지하는 D502-MG 세포들은 ENO1 null D423-MG 세포들보다 PhAH에 훨씬 더 저항적이라는 것은 의미없다. 또한, 중간 수준의 에놀라제 활성을 나타내는 U343과 D502는 PhAH에 대하여 중간 수준의 민감성을 나타내고, 이는 에놀라제 저해에 대하여 상대적 민감성을 암시한다. 끝으로, 헤어핀 저항성 ENO2의 재-발현에 의한 ENO2 활성 상승으로 ENO1 null D423-MG 세포들의 PhAH 민감성이 완전히 역전되었다(도 7).

표 1

유전체 변이 ID	연색체 좌위	TSG	CBM TCGA에서 분석	표적 상동체	변형 위치의 대한 연결성	경로	적체 관련 분자	세포 계층	표적 상동체의 돌이킬 수 없는 돌연변이	유전체 사건과 함께 TCGA CBM ID
EN01	1p36.2	2	5359	EN02	SCD, FB, WB	염색체와 상동체	포스포노이세트트히드록시 메이트	GI56, H421-MG, H527-MG, H592-MG	생존 및 번식가능	06-0137, 06-0879, 02-0290, 08-0331, 02-0658
EN02	1p36.2	2	5359	EN03	SCD, FB, WB	5단말 포스페이트	메틸드모세틱인드모스테인	GI56, H421-MG, H527-MG, H592-MG	NA	06-0137, 06-0879, 02-0290, 08-0331, 02-0658
KRFB	1p36.2	2	1339	KR1AC	없음	염색체 격리	"염색체이용가능"	NB1	출생후 재식생가능	06-0879
NNNNT1	1p36.2	2	2359	NNNNT23	SCD	NAD+ 생합성	NP5AD, NP4AD, 및 NP3AD	GI56, H527-MG, NB1	NA	06-0879, 06-0137
UBB2B	1p36.2	2	2359	UBB3A	없음	폴리우레틴	NA	GI56, H527-MG, NB1	NA	06-0879, 06-0137
AC01	9p21.1	1	1359	AC02/AC03	SCD, MGI	핵 DNA/단백질 산화	폴리오르비트라이드	TS561	NA/노년 신경병행	06-0127, 06-1802
KLHL9	9p22	1	1359	KLHL13	없음	염색체 분리	"염색체이용가능"에게 영향	면역 기작 관련된 SVT088	NA	06-0148, 02-290, 06-0125 및 많은 다른 것들
PANK1	10q23.31	1	5359	PANK3	FB, SCD, WB	이세틴-GA 생합성	포스포리보시메이트	TR673, TR637, TR75386	생존 및 번식가능	06-1087, 14-1825, 09-1786, 08-0386, 09-0963
KIF20B	10q23.31	1	5359	KIF20A	FB	염색체 분리/세포자멸	피코모트라이드	TR673, TR637, TR75386	NA	06-1087, 14-1825, 09-0963, 08-0386, 09-1786

표 2

ENO 상동체들의 분포 및 기능상실 표현형

유전체 변이 ID	위치	발현	녹아웃 마우스 표현형	관련된 인간 유전적 질환
ENO1	1p36	산재	치사 E10	용혈성 빈혈
ENO2	12p13	CNS	생존가능, 번식가능	설명된 것 없음
ENO3	17p11	근육	N/A	당원 저장 장애

[0231]

[0232]

표 3

결정된 유전자	영향을 받은 경로	가능한 공조 물질들	영향을 받은 경로	이유
ENO1	당분해 및 당신생	뉴클레오타이드 유사체들 (시타리민, 5-FU, 겐시타민, 엡칸트포핀, 티오구아닌), 인돌리시이플린 (가황 독소투비신)	핵산 합성	핵산 합성을 위하여 이온성 염분해 중간생성물
		기타 합-당분해제 (가황 3-브로모페놀레이트, 2-DG, 로디드아이비드)	당분해	당분해에 공조적 효과
		미토콘드리아 호흡기 억제제들 (안티마이신 A, 올리코마이신, 루비논)	미토콘드리아 호흡기 인체	세포에서 두 가지 주요 에너지 생성 경로의 분할
H6PD	오랄당 포스페이트 회피	뉴클레오타이드 유사체s (시타리민, 5-FU, 겐시타민, 엡칸트포핀, 티오구아닌), 인돌리시이플린 (가황 독소투비신)	핵산 합성	PPP는 핵산용 당 합성에 필수적이다.
KIF1B	염색체 분리	빈카 알칼로이드 (빈크리스틴, 빈블라스틴), 피롤리타셀, 도세탁셀	미소관 어셈블리	둘다 세포 분할 경로에 작용한다
NNNATI	NAD+ 생합성	EK 866	NAD+ 생합성 억제제	NAD+ 생합성에 의존적 효과
UBB4B	폴리우머퀴틴 의존적 분해	포르테아졸 억제제들 (Bortezomid)	유비퀴틴 의존적 단백질 분해	둘다 적절한 단백질 분해를 위해서는 작용한다
ACOI	철 대사/구연산 사이의 조절	빈카 알칼로이드 (빈크리스틴, 빈블라스틴), 피롤리타셀, 도세탁셀	미소관 어셈블리	둘다 세포 분할 경로에 작용한다
KIF19	염색체 분리	빈카 알칼로이드 (빈크리스틴, 빈블라스틴), 피롤리타셀, 도세탁셀	미소관 분해 차단	지방산 재합성에서 공조적 억제 효과
PANK1	이세틸-CoA 생합성	지방산 합성효소 억제제들	지방산 재합성의 합성	둘다 세포 분할 경로에 작용한다
KIF20B	염색체 분리/세포질분열	빈카 알칼로이드 (빈크리스틴, 빈블라스틴), 피롤리타셀, 도세탁셀	미소관 어셈블리	둘다 세포 분할 경로에 작용한다

표 4

공지의 에놀라제 저해제들의 일반적인 성질.

저해제	Ki (M)	작용 방식
D-타르트르네이트 세미알데히드 포스페이트	10 ⁻⁵	기질 유사체, 경쟁적 저해제
3-아미노에놀피루베이트-2-포스페이트	10 ⁻⁷	기질 유사체, 경쟁적 저해제
포스포노아세토히드록사메이트	1.5x10 ⁻¹¹	중간 유사체
2-플루오르-2-포스포노아세토히드록사메이트	N/A	중간 유사체
(3-히드록시-2-니트로프로필)포스포네이트	10 ⁻⁹	중간 유사체
(니트로에틸)포스포네이트	10 ⁻⁶	중간 유사체
d-(포스포노에틸)니트로레이트	1.4x10 ⁻⁸	중간 유사체
플루오르화물	다른 이온 농도에 따라 변화됨	아단위 협력을 저해한다

[0234]

[0235] 실시예 3 - ENO1의 결실은 세포들이 당분해 저해제들에 대하여 민감해지도록 한다

[0236] 암 게놈들은 발암 조정 및 종양 억제자 유전자들을 각각 표적으로 하는 무수한 복사체 수 증폭과 결실을 특징으로 한다. 흔히, 이들 게놈 변경은 많은 지역적 사건들로서 의도된 표적(들)에 추가하여 다른 많은 유전자들에게 영향을 준다. 이러한 광범위한 게놈 변경이 암 세포에 대항하여 음성적으로 선택되지 않는다는 사실은 그들 자체에서 이들 이웃하는 패신저의 복사체 수 변경이 임의의 해로운 생물학적 결과를 보유하지 않아야 한다는 것을 의미한다. 이러한 패신저 게놈 사건들은 이들 세포에 독특한 의도되지 않은(병립) 취약성을 만들 수 있다는 것을 생각할 수 있으며; 가령 패신저가 공동-결실된 패신저가 필수 항시발현 기능을 하는 중복 다중-유전자 패밀리의 구성원일 때. 무척추동물 뿐만 아니라 마우스에서 유전적 상호작용 연구의 대부분에서 많은 필수 세포의 항시발현 기능들은 중첩 기능을 인코딩하는 다중 상동성 유전자들에 의해 실행되며; 이러한 중복중복성 (redundancy)은 한 상동체가 상실되는 경우에도 세포는 생존하게 되지만, 다중 상동체가 상실되는 경우 치사를 초래한다(Vavouri 외, 2008; Costanzo 외, 2008; Deutscher 외, 2006). 이러한 개념적 토대에서, 중복 필수 하우스키피ng 유전자들의 동형접합성 결실은 암-특이적 취약성을 만들 수 있으며, 이로 인하여 결실되지 않은 제 2 상동체의 약리학적 비활성화로 인하여 이들 두 유전자들은 고유한 상태로 발현되는 건강한 정상적인 세포들의 손상 없이, 결실을 가진 종양 세포 안에 활성은 완전히 상실될 것이라고 가정하였다.

[0237] 세포 필수 활성화에 관련된 유전자들을 표적으로 하는 동형접합성 결실에 대하여 Cancer Genome Atlas (TCGA) GBM 데이터 세트를 검사함으로써(Cancer Genome Atlas Research Network, 2008), 1p36 종양 억제자 좌위에 위치하는 ENO1 유전자가 후보로 식별되었다. 3개의 상동성 유전자에 의해 인코드되는 에놀라제는 2-포스포글리세린산을 포스포에놀피루베이트로 전환시키는 당분해의 최종 단계의 바로 전단계를 촉매하는 필수 효소다. 포유류에

서, 에놀라제 활성은 3가지 유전자들에 의해 인코딩된다: 도처에서 발견되는 *ENO1* (Joseph 외, 1996; Stefanini, 1972); 뉴런 조직에서 독점적으로 발견되는 *ENO2* (Joseph 외, 1996; Kobayakawa 외, 2007); 그리고 근육 조직에서 발견되는 *ENO3* (Comi 외, 2001). *ENO1*은 세포 에놀라제 활성의 75-90%를 담당하는 GBM에서 주요 에놀라제 이소폼이다(Joseph 외, 1996). 정상 세포와 특히 종양 세포들의 에너지 생산에 있어서 당분해의 결정적 중요성을 감안하면 (Wise and Thompson, 2010), *ENO1*에 대한 GBM 종양 동형접합성 null은 에놀라제 2의 저해에 매우 민감할 것으로 예상되며, 한편 정상적인 뉴런 조직들은 에놀라제 1의 기능적 과잉에 영향을 받지 않아야 할 것이다. 상응하여, *ENO2* 녹아웃 마우스는 생존하며, 번식할 수 있는데, 이는 에놀라제 2의 약리학적 저해가 유기체 수준에서 필시 잘 용인될 것임을 암시한다. 더욱이, 몇 가지 에놀라제-상동체를 보유하는 *S. cerevisiae*(*Saccharomyces cerevisiae*)는 한 개 돌연변이를 가진 약한 표현형을 나타내고, 모든 상동체들이 결실된 경우에만 세포 치사가 발생되며(Constanzo 외, 2008; Deutscher 외, 2006); 케노르하브디티스 엘레간스(*Caenorhabditis elegans*)와 초파리(*Drosophila*)는 에놀라제 활성을 인코딩하는 오직 하나의 유전자를 보유하여, 이의 결실은 치명적이다(Sonnichsen 외, 2005).

[0238] 몇 가지 후보 종양 억제자 유전자들을 포함하는 1p36 좌위(Bagchi and Mills, 2008)는 GBM에서 빈번한 결실이 지속된다 (도 1a) (Joseph 외, 1996). 1p36 좌위는 GBM의 1-5%에서 동형접합적으로 결실되고(Cancer Genome Atlas Research Network, 2008; Duncan 외, 2010) (뿐만 아니라 펩지신경교종 (Kotliarov 외, 2006) 그리고 거대-세포 신경내분비 폐 종양 (Peng 외, 2005))에서 결실되며, 그리고 *ENO1*은 이 결실에 대개 포함된다. TCGA 복사체 수 이상(단일 뉴클레오티드 다형성 [SNP]과 어레이 비교 게놈 혼성화 [aCGH] 데이터) (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008) 및 발현 프로파일을 검사함으로써, 5/359 GBM 시료들은 *ENO1*의 동형접합성 결실과 관련된 이의 발현이 거의 완전하게 부재한 것으로 식별되었다(도 1b와 도 4). 2가지 GBM 세포 계통, D423-MG (Duncan 외, 2010)와 Gli56 (Mueller 외, 2007)는 1p36 좌위에서 *ENO1*까지 펼쳐진동형접합성 결실을 가진 것으로 식별되었다. 3번째 GBM 세포 계통, D502-MG (Duncan 외, 2010) 또한 이 좌위에서 많은 유전자들의 동형접합성 결실이 일어나지만, *ENO1*은 고유한 상태로 남겨져 있고, 따라서, 우수한 대조군이 된다(도 1c). 웨스턴 블랏 분석으로 D423-MG와 Gli56에는 에놀라제 1의 상실과 에놀라제 2 단백질은 유지됨이 식별되었고, 반면 D502-MG과 테스트된 모든 다른 신경교종과 정상적인 교의 세포 계통에는 이들 단백질이 존재하였다(도 1d).

[0239] D502-MG (*ENO1* 야생형 [WT])와 D423-MG (*ENO1*-null) 세포 계통은 *ENO1* WT 또는 null 배경에서 *ENO2*의 shRNA-매개된 녹다운 충격을 평가하는데 이용되었다. 2가지 독립적인 *ENO2* shRNA들은(pLKO.1 벡터) 강력한 단백질 변성을 초래하였고, 이는 *ENO1* 게놈 결실에서만 세포 성장의 상당한 저해로 이어졌다(도 5). 추가적인, 독립적인 *ENO2* shRNA (pGIPZ 벡터)를 이용하여도 동일한 결과가 획득되었다(도 6a,b). 더욱이, *ENO1*-null 세포들에서 *ENO2*의 shRNA 제거는 연결 한천 콜로니 형성의 감소와 두개내 주사된 세포들의 생체내 종양생성 가능성의 차단을 초래하였다 (도 1e 및 도 6c). 끝으로, 데옥시사이클린-유도성 TRIPZ 벡터를 이용한 *ENO1*-null 세포들에서 *ENO2* 제거의 선택적 독성은 동계 배경에서 설명되었다. 이러한 데옥시사이클린-유도성 시스템이 *ENO1* WT 세포 계통 (U87, A1207, LN319)에서 이용될 때, 2가지 독립적인 shRNA들은 에놀라제 1 수준에는 영향을 주지 않고(데이터 없음), 감소된 에놀라제 2 단백질 수준을 >70% 감소시킨다(도 2a). *ENO2*의 제거는 *ENO1*-null D423-MG 세포 계통에서만 세포 증식을 상당히 저해하였다 (도 2b). 더욱이, 헤어핀-저항성 *ENO2*의 cDNA의 강화된 발현은 sh*ENO2* 헤어핀의 유해한 효과를 완전하게 역전시키는데 (도 7), 이것은 헤어핀의 이러한 저해 효과가 *ENO2* 감소된 발현에 특이적이지만, 표적을 벗어난 효과는 아님을 보여준다. 끝으로, *ENO1*이 *ENO1*-WT GBM 계통에서 관찰되는 것과 유사한 수준으로 D423-MG (*ENO1* null) 세포 계통에서 정상적인 위치를 벗어나 재-발현될 때, shRNA의 *ENO2* 제거에 대한 유해한 영향은 완전하게 없어졌다(도 8).

[0240] 그 다음, *ENO1* WT와 null 세포들에서 에놀라제 활성의 약리학적 저해의 영향이 평가되었다. 기존 연구들은 특히 항기생충 목적으로 에놀라제의 약리학적 저해에 중점되었고(Navarro 외, 2007), 그리고 많은 화합물들이 특정화되었는데, 대부분은 반응-중간 유사체들로 작용하였다(표 5).

[0241] 표 5: 발표된 에놀라제 저해제들의 일반적인 성질들. 과거에 범-에놀라제 저해제들의 대부분은 효소의 기전 연구를 위한 수단으로 합성되었으며, PhAH가 가장 효능이 큰 것으로 나타났다. 대부분 저해제들은 반응물질(2-포스포글리세레이트)과 생성산물(포스포에놀피루베이트) 부분의 중간 구성을 보여주고 있어 전이 상태 유사체로 작용하는 것으로 간주된다. 저해제들로 작용하는 것들은 이온화된 형태이며, pKa 값들은 8에서 12까지 변화되기 때문에 이들 저해제들의 효과적인 IC50은 표에 열거된 것들보다 더 낮다는 것을 주지해야 한다. PhAH의 경우에서 pKa는 10.2이고, 생리학적 pH에서, IC50은 대략 15nM인 것으로 예상된다(Navarro 외, 2007).

표 5

저해제	Ki (M)	pKa	작용 방식	참고문헌
D-타르트로네이트 세미알데히드 포스페이트	10 ⁻⁵	pH 독립적인	기질 유사체, 경쟁적 저해제	Hill 외, 2000
3- 아미노에놀피루베이트2 포스페이트	10 ⁻⁷	N/A	기질 유사체, 경쟁적 저해제	Hill 외, 2000
포스포노아세토히드록 사메이트	1.5 x 10 ⁻¹¹	10.2	중간 유사체	Hill 외, 2000, Moore 외, 1994
2-플루오르-2- 포스포노아세토히드록 사메이트	1.4 x 10 ⁻⁶	8.1	중간 유사체	Moore 외, 1994
(3-히드록시-2- 니트로프로필)포스포네 이트	6 x 10 ⁻⁹	8.1	중간 유사체	Hill 외, 2000
(니트로에틸)포스포네이 트	10 ⁻⁶	8.5	중간 유사체	Hill 외, 2000
d- (포스포노에틸)니트로레 이트	1.4 x 10 ⁻⁸	N/A	중간 유사체	Hill 외, 2000
플로오르화물	다른 이온 농도에 따라 변화됨		아단위 협력을 저해함	Smith 외, 2006

[0242]

[0243]

가장 강력한 에놀라제 저해제는 PhAH이며 (Anderson 외, 1984), 이것은 효모 에놀라제에서 15pM의 저해상수를 가진 전이-상태 유사체로 작용하는 것으로 간주된다. 인간 에놀라제에서 PhAH를 테스트하지는 않았지만, 기존 작업에서 관련이 먼 유기체의 에놀라제에서 저해 효과가 설명되었고(Navarro 외 2007; Anderson 외, 1984; Duncan 외, 2010) 이는 넓은 범위의 계통발생적 거리에 걸쳐 이의 잠재적 용도를 암시하는 것이다. PhAH는 약 20nM의 IC₅₀으로 인간 GBM 세포주의 고유 용해물에서 시험관내 에놀라제를 강력하게 저해할 수 있었다(도 3b). 0.625 μM 내지 50 μM 범위의 농도로 PhAH를 이용하면, ENO1- null 세포들에서 상당한 독성이 관찰되었고 (도 3a, c, d 및 도 9), ENO1 null 세포들과 비교하였을 때 에놀라제 활성이 최소한 10-배 더 큰 것을 보여준 ENO1-WT 대조군에는 최소한의 영향이 관찰되었다(도 3b; 그 이유는 ENO1은 총 세포 에놀라제 활성의 90%를 차지한다; Joseph 외, 1996). 비록 PhAH의 IC₅₀은 시험관에서 ENO1과 ENO2에 대해 유사하지만(데이터 나타내지 않음), 이들 세포에서 에놀라제 활성은 ENO1-WT 세포 계통과 비교하여 충분히 90% 더 낮다(90%, "사전-저해된")는 사실로부터 ENO1 null 세포들 (Gli56, D423-MG)에 대한 이 저해제의 독성이 더 클 것이라고 유추되며, 결과적으로 임계치 독성 이하로 전체 에놀라제 활성을 감소시키는데 훨씬 더 적은 분량이 요구된다. 더욱이, 데이터는 에놀라제 활성의 수준과 상이한 세포 계통에 걸친 PhAH에 대한 민감성 간에 직접적인 상관관계를 나타내며, 그리고 동일한 세포 계통내에서도 상이한 수준의 강제된 에놀라제 발현을 가진다. 우선, 다른 세포 계통과 비교하였을 때 중간 수준의 에놀라제 활성(그리고 에놀라제 1 단백질 발현, 도 1d)을 가진 U343과 D502-MG 세포들은 PhAH에 대하여 중간 수준의 민감성을 보유하고 (도 3), U343의 경우, ENO1 또는 ENO2의 정규장소밖의 과다발현에 의해 구제될 수 있다 (데이터 제시하지 않음). 다양한 수준의 강요된 ENO1 또는 ENO2의 발현을 가지는 D423-MG 세포 계통에서 PhAH의 전체적인 역가는 에놀라제 발현/활성의 수준과 PhAH에 대한 결과적인 저항간에 직접적인 상관관계를 보여준다(도 9). Gli56 ENO1-null 세포들에서 ENO1의 생리학적 수준의 정규장소밖의 발현에 의해

또는 ENO2의 과다발현에 의해 PhAH 독성 또한 없어졌다(도 9). 독성 기전에 있어서, 세포 사이클 및 자가 사멸 분석에서, 48시간 동안 PhAH 처리로 D423-MG에서 S-상의 급격한 감소를 유도하고, 이어서 자가사멸이 현저하게 증가되었지만, ENO1 WT U373 세포들에서는 이러한 것이 없음이 설명되었다. 이러한 효과는 ENO2 과다발현에 의해 완벽하게 탈환되었다. 이러한 성장 저해 및 후속적인 자가사멸은 에너지 위기로 인한 것이라는 사실은 ENO1 WT 세포 계통에서는 관찰되지 않지만, D423-MG에서 관찰된(테아터 나타내지 않음) 포스포릴화된 AMPK (Thr172) 부분의 강력한 유도에 의해 확증된다. 이러한 에너지 스트레스 반응은 보호 효과를 발휘하고, 따라서 AMPK 저해제와 PhAH의 동시 추가는 추가 독성을 초래할 것이라고 생각된다. 끝으로, ENO1 null 세포들은 ENO1 WT 세포들과 비교하여 다른 분자 표적이 된 요법들, 가령 수용체 티로신 키나제 저해제들(Stomme 외, 2007) (라파티니브, 소라페니브, PHA665752)(도10)과 라파마이신의 복합에 대해 더 큰 민감성을 나타내지 않는다. 이들 데이터에서 D423-MG 세포들은 다른 항암 물질들에 대하여 광범위하게 민감하지 않으며, 그리고 PhAH는 ENO1 null GBM 세포들을 선택적으로 표적한다는 것이 나타난다.

[0244] 이와 함께, 유전적 그리고 약리학적 결과들로부터 에놀라제 2 저해는 1p36 동형접합성 결실과 ENO1의 병립 상실을 가진 세포들에서는 치명적이며, 한편 ENO1 고유한 세포들은 당분해를 겪고, 생존을 지원하기 위하여 에놀라제 1에 의존할 수 있다는 것이 설명된다. 이러한 발견들은 무척추동물의 유전적 데이터와 일치된다 (Costanzo 외, 2008; Deutscher 외, 2006). 몇몇 동형접합성 결실된 하우스키핑 유전자들이 1p36 상에서 동일한 결실에서 발생할 수 있음을 감안하면(가령 *H6PD*), ENO2의 저해와 동시에 결실된 하우스키핑 유전자의 또다른 상동체의 저해와 복합됨으로써 효과 및 암-세포 특이적 사멸을 더 증가시킬 가능성이 있다.

[0245] 더욱이, 이들 연구에 따르면, ENO1 좌위에서 이형접합성인 세포들, 가령 U343은 야생형 아교모세포종 세포 계통과 정상적인 정상세포들보다 에놀라제 저해제 가령 포스포노아세토히드록사메이트에 의한 독성에 더욱 민감하다. 도 1, 3 및 11은 이러한 데이터를 강조한다. 도 1d에서 D502-MG와 U343 세포들은 ENO1의 이형접합성 결실에 대응하여 에놀라제 1 발현의 감소를 보여준다. 도 3과 11에서 분량 반응 연구에 의해 나타난 것과 같이, 이들 세포는 야생형 세포 계통보다 PhAH의 독성 효과에 상당히 더 민감하다. 이러한 효과는 이들 세포에서 ENO1 또는 ENO2의 과다 발현에 의해 부분적으로 역전될 수 있음이 밝혀졌다. 관심대상의 이형접합성 세포들은 올리고마이신을 이용한 처리에 의해 PhAH의 효과에 더 민감하였다. 따라서, ENO1 이형접합성 암 세포들은 당분해 저해제-기반 요법들에 있어서 유망한 표적들이다.

[0246] **실시예 4 - 실시예 3의 재료 및 방법**

[0247] 20% 태아 소 혈청과 함께 Dulbecco의 변형된 Eagle 배지에서 표준 기술에 의해 세포들이 배양되었다. shRNA 실험은 293T 세포들의 일시적 형질감염에 이어서 4 µg/mL 폴리브렌을 함유하는 배지에서 형질유도, 그리고 2 µg/mL 퓨로마이신의 선별에 의한 렌티바이러스 생산을 통하여 실시되었다. shRNA 발현은 1 µg/mL 테옥시사이클린에 의해 유도되었고, 녹 다운은 웨스턴 블랏에 의해 테스트되었다. shRNA-저항성 ENO2 클론은 QuickChange 부위 지향된 돌연변이생성 키트(Stratagene)를 이용하여 침묵 돌연변이를 도입하고, 그 다음 pHAGE-CMV 렌티바이러스 벡터 안으로 클로닝시켜 만들었다. 세포 증식 실험은 크리스탈 바이올렛 착색, CellTiter-Glo 분석(Roche)을 이용하고, 그리고 IncuCyte (Essen Bioscience)를 이용하여 함유를 측정함으로써 수행되었다. SCID 마우스에서 ENO2 녹다운과 함께 그리고 녹다운 없이 D-423MG 세포들의 정위 두개내 주사는 이미 설명된 것과 같이 실시되었다(Zheng 외, 2008). 상기 세포들의 연결 한천 콜로니 형성 분석은 표준 기술을 이용하여 6-웰 플레이트에 10⁴ 개의 세포를 접종시킴으로써 실시되었다. 저해제 연구를 위하여, PhAH 리튬 염은 Anderson 외 (1984) 부분의 프로토콜에 따라 TCRS에서 맞춤 합성되었다. 에놀라제 활성 분석을 위하여, 기존에 설명된 것과 같이 피루베이트 키나제-젯산염 데히드로게나제 연결된 반응에서 NADH 산화가 측정되었다 (Joseph 외, 1996). 세포 사이클 연구를 위하여, 48시간 동안 PhAH와 함께 또는 PhAH 없이 세포들을 배양하였고, 프로피디움 요오드화물로 착색되었으며, 유동 세포분석에 의해 분류되었다. Annexin V/7-AAD 분석을 위하여, 96시간 동안 PhAH와 함께 또는 PhAH 없이 세포들을 처리하고, Annexin V-PE와 7-AAD로 착색시키고, 그리고 제조업자의 프로토콜(Biovision)에 따라 유동 세포 분석법으로 자가사멸에 대하여 평가하였다.

[0248] 세포 배양

[0249] 세포 계통 D423-MG은 ENO1을 포함하는 1p36 동형접합성 결실된 것이며, D502-MG는 ENO1을 제외한 1p36 동형접합성 결실된 것이다(Duncan 외, 2010). 세포들 D423과 D502는 Duncan 외에서 H423과 H502로 명명되지만, Wellcome Trust Sanger Institute database에서는 D423-MG와 D502-MG로 명명되며, 본 명세서에서는 이 명명법이 채택되었다(world wide web at sanger.ac.uk). Gli56은 Mueller 외 (2007)에서 설명되었다. D423-MG에서 결실은 *CAMTA1*, *VAMP3*, *PER3*, *UTS2*, *TNFRSF9*, *PARK7*, *ERRFI1*, *SLC45A1*, *RERE*, *ENO1*, *CA6*, *SLC2A5*, *GPR157*,

MIR34A, H6PD, SPSB1, 및 SLC25A33 유전자들에 걸쳐있으며, Gli56에서 결실은 UTS2, TNFRSF9, PARK7, ERRFI1, SLC45A1, RERE, ENO1, CA6, SLC2A5, GPR157, MIR34A, H6PD, SPSB1, SLC25A33, TMEM201, C1orf200, PIK3CD, CLSTN1, CTNBP1, LZIC, NMNAT1, RBP7 및 UBE4B 좌위에 걸쳐있다. 20% 태아 소 혈청(FBS)과 함께 Dulbecco 변형된 Eagle 배지(DMEM)에서 표준 기술에 의해 세포들이 배양되었다. 비교용으로, 세포 계통 U87, LN319, SW1088, U343, U373, 및 A1207이 동일한 조건하에서 성장되었다. 정상적인 인간 정상세포들은 ScienCell에서 구하였다.

[0250] ENO2 발현의 shRNA 녹다운

[0251] ENO2를 표적으로 하는 22개의 헤어핀이 선별되었고, 단백질 수준이 <50%로 감소된 4개의 독립적인 헤어핀이 발견되었다. 이들 헤어핀중 2개는 pLK0.1 벡터에 있었고(shENO2-1과 shENO2-2), 그리고 나머지 두 개는 Expression Arrest GIPZ (shENO2-3)와 TRIPZ (shENO2-4) shRNAmir 벡터 (Open Biosystems)에 있었다. ENO2 shRNA 서열들은 다음과 같다:

[0252] shENO2-1: 5'-CAAGGGAGTCATCAAGGACAA-3' (서열 번호:1);

[0253] shENO2-2: 5'-CGCCTGGCTAATAAGGCTTTA-3' (서열 번호:2);

[0254] shENO2-3: 5'-CGGCCTCAACGTGATCAA-3' (서열 번호:3);

[0255] shENO2-4: 5'-GGGACTGAGAACAATCCA-3' (서열 번호:4).

[0256] GIPZ 벡터에 있는 헤어핀은 제조업자가 제시하는 프로토콜에 따라 TRIPZ 벡터에 클론되었다. TRIPZ 벡터는 테옥시사이클린 유도시에만 발현되는 붉은 형광 단백질 리포터를 가진 테옥시사이클린-유도성 시스템이다. 재조합 렌티바이러스 입자들은 표준 프로토콜에 따라 293T 세포들의 일시적인 형질감염에 의해 만들어졌다. 간략하게 설명하자면, 72 μ g의 shRNA 플라스미드, 54 μ g의 Delta 8.9 플라스미드 그리고 18 μ g의 VSVG 플라스미드는 Fugene(Roche)를 이용하여 245 mm² 접시에 도말된 293T 세포에 형질감염된다. 바이러스성 상청액은 형질감염 이후 72시간에 수거되며, 23,000 rpm에서 원심분리에 의해 농축되고, 그리고 세포 성장 배지에 재현탁된다. 형질유도를 위하여, 바이러스 용액은 4 μ g/mL 폴리브렌이 함유된 세포 배양 배지에 추가되며; 48시간 후, 2 μ g/mL 퓨로마이신을 이용하여 감염 세포들이 선택되며, 웨스턴 블랏으로 ENO2 녹다운에 대하여 테스트된다.

[0257] ENO1, ENO2 및 shRNA-저항성 ENO2의 정규 장소 이외에서 발현

[0258] 세포 계통 D423-MG에서에서 ENO2의 녹다운 표현형 효과의 구체는 ENO2의 shRNA-저항성 형태를 과다발현에 의해 실행된다. 간략하게 설명하자면, QuickChange Kit (Stratagene)에 따라 부위-지향된 돌연변이생성을 이용하여 shENO2-4의 표적이 되는 ENO2 코딩 영역으로 6개의 침묵 돌연변이들이 도입된다. shRNA-저항성 ENO2 코딩 영역은 pHAGE-CMV 렌티바이러스 벡터(D.N. Kotton의 기부로 얻음) 안에 클론되고, 그리고 테옥시사이클린 존재 또는 부재하에 shENO2-4를 가진 D423-MG 계통에서 과다발현된다. 대조군으로, 녹색 형광 단백질(GFP) 유전자를 가진 렌티바이러스 벡터에 의해 동일한 세포 계통이 감염된다. ENO1 또는 ENO2의 정규장소밖의 재-발현을 위하여 서열이 식별된 cDNA 클론들은 pHAGE-CMV 렌티바이러스 벡터의 입구에 클론되었고, 상기에서 설명된 것과 같이 신경교종 세포 계통으로 렌티바이러스에 의해 형질도입되었다.

[0259] 증식 분석과 앵커리지-독립적인 성장

[0260] shRNA- 또는 PhAH-처리된 세포 계통의 세포 성장은 크리스탈 바이올렛 착색을 통하여 또는 Promega CellTiter-Glo 증식 키트 (Roche)을 이용하거나 또는 대안으로, 생체내에서 IncuCyte (Essen BioScience)와의 합류를 측정함으로써 분석되었다. IncuCyte를 이용한 성장 곡선은 사중 복사체로 매 2시간 마다 영상화시켜 만들었다. 크리스탈 바이올렛 분석을 위하여, 각 시점에 6-웰 플레이트에 10⁴개의 세포들이 접종된다. 표시된 시점에서, 세포들은 10% 포르말린에 고정되고, 1시간 동안 크리스탈 바이올렛 용액으로 착색된다. 10% 아세트산 용액을 이용하여 염료 추출이 실행되고, 590 nm에서 흡수도가 판독되었다. CellTiter-Glo 실험은 제조업자의 지시에 따라 실행된다; 각 시점에서 96 웰 플레이트에 웰당 10³개의 세포들이 도말되고, 매 24시간마다 형광 판독이 실시된다. 모든 실험은 3회 반복된다. 연결 한천 (앵커리지-독립적인) 성장은 표시된 유전자형의 10⁴ 세포들이 접종된 6-웰 플레이트에서 관찰되었다. 이 배지에는 10% FBS와 DMEM이 포함되어 있다; 상부 한천에는 0.4% 낮은 용점 아가로스가 포함되어있고, 바닥 한천에는 1% 낮은 용점 아가로스가 포함되어있다. 성장은 형광(GFP)으로 관찰되었으며, 28일 후 콜로니는 요오드니트로테트라졸리늄클로라이드(Sigma-Aldrich)로 착색되고, 카운트되었다.

- [0261] 정위(orthotopic) 뇌 종양생성 분석
- [0262] pGIPZ를 통하여 전달된 비-표적 헤어핀 또는 shENO2-3으로 형질유도된 D423-MG 세포들의 생체내 종양생성 가능성은 이전에 설명된 것과 같이 결정되었다. (Zheng 외, 2008). SCID 마우스(Charles River)는 Z 축(Stoelting)이 구비된 정위(stereotactic) 장치 안에 두었다. 10- μ l Hamilton 주사기를 이용하여 뇌의 표면 아래 3mm 우측 꼬리핵(caudate nucleus)으로 3×10^5 개의 세포를 주사하였다. 신경성 결손의 발생에 대해 동물들을 매일 지켜보았다. 모든 마우스 실험은 Harvard Cancer Center and Dana-Farber Cancer Institute Institutional Animal Care and Use Committee의 승인하에 실시되었다.
- [0263] 에놀라제 활성 분석
- [0264] 이미 설명된 것과 같이(Joseph 외, 1996), 피루베이트 키나제-젓산염 데히드로게나제 연결된 분석에서 NADH 산화를 통하여 에놀라제 활성이 측정되었다. 간략하게 설명하자면, 세포들은 20 mM Tris HCl, 1 mM EDTA 그리고 1mM β -말캅토에탄올 (pH 7.4)에 용해되었고, 10초간 3회씩 폴리트론 균질화기를 이용하여 균질화된 후, 초음파 파쇄되었다. 340 nm에서의 흡수에 의해 광학적으로 또는 340nm에서 여기되고, 460nm에서 방출되는 형광에 의해 NADH 산화를 측정함으로써, 에놀라제 활성은 기록되었다.
- [0265] 웨스턴 블랏
- [0266] 2회 인산염-완충된 염수(PBS) 세척 후, 세포들은 약하게 흔들리면서 RIPA 완충액에서 15분 동안 배양된다. 그 다음 용해물이 수거되고, 초음파파쇄되고, 4°C에서 10분간 14,000 RPM에서 원심분리된다. SDS-PAGE와 웨스턴 블랏은 전술한 것과 같이 실시된다(Taniuchi 외, 2005). 다음의 항체들이 이용되었다: Cell Signaling Technologies의 에놀라제 1, CST#3810; 에놀라제 2, #9536; 그리고 GAPDH CST# 3683; 포스포-AMPK Thr172 CST# 2535 그리고 Sigma-Aldrich의 빈쿨린.
- [0267] 저해제 연구
- [0268] PhAH 리튬 염은 Anderson 외, 1984의 프로토콜에 따라 TCRS 에 의해 맞춤 합성되었다. NMR에 의해 구조 및 순도는 입증되었다. PhAH는 PBS에 50mM 비축액으로 용해되고, 사용할 때까지 -80°C에서 냉동보관되었다. 화합물의 불안정성을 고려하여, 배지는 매 5일 마다 교체되었으며, 새로운 저해제가 새로운 배지에 추가되었다. 라파마이신, 소라페니브, 라파티니브 및 PHA665752는 각각 LC Laboratories 및 Tocris Bioscience에서 구하였다.
- [0269] 세포 사이클 분석
- [0270] D423-MG와 U373 세포 계통은 PhAH (25 μ M) 존재하에 또는 부재하에 48시간 처리되었고, 하룻밤 동안 -20°C에서 75% 에탄올에 고정되었다. 다음 날, 이 세포들은 차가운 PBS로 세척되었고, 100 μ g의 RNase A (Qiagen)로 처리되었고, 그리고 50 μ g의 프로피디움 요오드화물(Roche)로 착색되었다. 3색 FACScan 유동 세포측정기 및 CellQuest 소프트웨어 (Becton Dickinson)를 이용하여 유동 세포측정 획득이 실행되었다. 각 시료의 경우, 10^4 회 사건들이 탐승되었다. ModFit LT (Verity Software House)를 이용하여 데이터 분석이 실행되었다.
- [0271] 자가사멸에 대한 Annexin V/7-AAD
- [0272] 96시간 동안 PhAH(25 μ M)와 함께 또는 PhAH 없이 D423-MG 및 U373 세포 계통들이 처리되었다. Annexin V/7-AAD 분석을 위하여, 세포들은 Annexin V-PE와 7-AAD으로 착색되었고, 제조업자의 프로토콜(Biovision)에 따라 유동 세포 분석법으로 자가사멸에 대하여 평가하였다. 자가사멸 세포들은 Becton-Dickinson FACScan 세포분석기를 이용하여 결정되었다. 초기 자가사멸 (어넥신 V-양성, 7-AAD-음성)과 후기 자가사멸 (어넥신 V-양성 및 7-AAD-양성) 세포들이 세포 사멸 결정에 포함되었다.
- [0273] 실시예 5 - 트레오닐-tRNA 합성효소 (TARS) 이형접합성 결실은 TARS 저해제들에 대해 세포들이 민감해지도록 만든다
- [0274] 발명자들은 TARS 저해제 보렐리딘에 대한 세포들의 민감성에 TARS 효과를 측정하기 위한 연구를 착수하였다. 우선, 게놈 복사체 수와 TARS 발현 간의 상관관계를 규정하기 위한 분석이 실행되었다 (도 19). 몇 가지 세포 계통에서 TARS 유전자 복사체 수를 결정하였고 (도 19a), 동일한 세포 계통에서 TARS의 mRNA 발현 수준에 대하여 이들 데이터가 플롯되었다(도 19b). 흑색종 세포 계통중에서, SK-MEL-2 세포들은 TARS에 대하여 이형접합성 결실을 보유하는 것으로 식별되었고, 451 Lu 세포들은 TARS 결함이 있는 것으로 식별되었으며, 그리고 SK-MEL-5 세포와 HEML 세포는 TARS에 대해 야생형인 것으로 식별되었다(도 20a). TARS 단백질의 발현 수준이 유전자 복사

체 수와 mRNA 발현 수준에 근거하여 예상된 수준에 대응하는지를 식별하기 위하여, 웨스턴 블랏팅이 실행되었다(도 20c).

- [0275] SK-MEL-2, 451 Lu, SK-MEL-5, 및 HMEL 세포들의 성장에 있어서 보렐리딘 처리 효과가 측정되었다. 낮은 농도의 보렐리딘 처리는 TARS에 대해 야생형인 HMEL 세포와 SK-MEL-5 세포의 성장에 최소의 영향 내지 영향이 없었다(도 20b). 대조적으로, SK-MEL-2 세포들의 성장은 동등하게 낮은 농도의 보렐리딘에 의해 중단되었다. TARS-결합 451 Lu 세포 계통은 보렐리딘 처리에 대하여 중간 민감도를 보였다.
- [0276] 시간 경과에 따라 4가지 흑색종 세포 계통의 성장에 있어서 다양한 농도의 보렐리딘 효과가 또한 연구되었다(도 21). HMEL 세포 계통은 테스트된 최대 농도, 62.5 nM에서도 보렐리딘 처리에 대하여 저항성이 있는 것으로 밝혀졌다. TARS에 대해 야생형인 SK-MEL-2 세포 계통은 62.5 nM의 보렐리딘에 대하여 부분적으로 민감성이었지만, 31.25 nM 미만의 농도에서는 저항성이 컸다. TARS 이형접합성 SK-MEL-2 세포 계통의 성장은 31.25 nM의 보렐리딘에 의해 완전하게 저해되었고, 3.9 nM와 같은 낮은 농도에서는 최소한 부분적으로 민감성이었다. TARS 결합 451 Lu 세포 계통의 성장은 62.5 nM의 보렐리딘에 의해 거의 저해되었고, 테스트된 모든 농도에서 TARS 이형접합성 SK-MEL-2 세포들과 TARS 야생형 세포들 사이에서 시종일관 중간수준이었다.
- [0277] 성장 분석에서 테스트된 최대 농도의 보렐리딘은 SK-MEL-2 세포 계통의 성장을 완전하게 저해시킨다는 것을 발명자들이 식별함으로써, 발명자들은 SK-MEL-2 세포들에 대한 보렐리딘의 세포 독성 효과를 테스트하였다. 이를 위하여, 발명자들은 동일한 생존 성장 분석을 실시하는데, 단, 0 시점에서 고탐류된 SK-MEL-2 세포들로 시작하였다. 이러한 조건하에서, 15 nM 또는 이 이상 농도의 보렐리딘은 SK-MEL-2 세포들에 대해 세포독성이며, 더 낮은 농도는 성장 저해성이었다는 것이 명백하게 드러났다(도 22).
- [0278] 4가지 흑색종 세포 계통에서 보렐리딘의 차등 효과는 TARS의 상대적인 발현 수준 때문이라는 것을 식별하기 위하여, 발명자들은 렌티바이러스 pCMV 벡터를 이용하여 SK-MEL-2 세포에서 정규장소이외에서 TARS를 발현시켰다. 세포들은 대조군으로 GFP- 그리고 CHEK1-발현 pCMV 벡터들로 형질유도되었고, 형질유도된 세포들에서 TARS 단백질 발현 수준은 웨스턴 블랏팅에 의해 식별되었다(도 23d). SK-MEL-2 세포들의 성장에 있어서 보렐리딘의 효과는 SK-MEL-2 세포들에서 외생 TARS의 발현에 의해 역전됨이 식별되었고(도 23b,c), 한편 GFP 또는 CHEK1의 발현은 보렐리딘에 대한 SK-MEL-2 세포들의 반응에 영향을 주지 않았다(도 23a,c). 도 24에 나타난 연구는 TARS 유전자 복사체 수와 mRNA 발현 수준은 세포에서 보렐리딘 민감성에 직접적인 상관관계가 있음을 식별하였다.
- [0279] 끝으로, 발현 수준이 DNA 유전자 복사체 수와 관련있는지를 식별하기 위하여 추가적인 ARS 유전자들이 연구되었다. 도 25에서 볼 수 있는 것과 같이, AARS, HARS, LARS 그리고 KARS 발현의 경우에 유의미한 상관관계가 현저하며, 이는 ARS 유전자들은 일반적으로 우수한 표적이며 항-암 요법의 생물학적 표식이라는 것을 나타낸다.
- [0280] **실시예 6 면역조직화학을 이용하여 동형접합성 ENO1 비활성화를 정확하게 탐지할 수 있다.**
- [0281] 항체들 결합 연구를 이용하여 ENO1 동형접합성 비활성화(가령, 결실)가 탐지될 수 있는 지를 식별하기 위한 연구가 실행되었다. 간략하게 설명하자면, ENO1 동형접합성 결실된 (D423-MG) 또는 WT (U87) 부분의 인간 암 세포 계통은 누드 마우스의 뇌로 주사되어, 종양이 형성되도록 하였다. 표준 조직병리 과정에 따라, 종양이 있는 뇌를 고정시키고, 파라핀 절편은 절단되었다. 마우스 세포는 라벨안되며 인간 세포들만 라벨되는 NUMA (S2825, Epitomics)에 대항하는 항체로 헤마토실린/에오신으로 착색된 D423-MG ENO1 null 종양 세포들을 착색함으로써 형태가 용이하게 탐지될 수 있다. ENO1(11204-1-AP, Protein Tech)에 대항하는 항체를 이용한 착색은 광범위하게 발현되는 하우스키핑 유전자로부터 예측되는 것과 같이 정상적인 마우스 뇌에서 강력한 면역반응을 보여주었다. 예상한 것과 같이, D423-MG ENO1 null 종양에서는 착색을 볼 수 없으며, U87 ENO1 WT 종양에서는 강력한 착색을 볼 수 있다. 이들 결과에서 ENO1 단백질에 대항하는 면역조직화학으로 ENO1 null 종양을 식별하는 것이 가능하며, 이 방법은 가령, ENO2 저해제로부터 이익을 얻을 수 있는 환자를 선별하는데 이용될 수 있다.
- [0282] **실시예 7 - CHEK1 단백질 발현은 게놈 복사체 수와 관련되지 않으며, CHEK1의 과다발현은 CHEK1 저해제에 대해 저항성을 부여하지 않는다.**
- [0283] 상기에서 보여준 ARS 유전자들과 에놀라제 유전자들의 결과와 대조적으로, CHEK1 단백질 발현은 게놈 복사체 수와 관련없음이 연구에서 나타났다. COMIC (Sanger Center) 부분의 게놈 복사체 수에서 염색체 11상의 CHEK1은 세포 계통 SK-MEL-2에서는 오직 하나의 복사체만을 가진다(도 26a). 사실, 마이크로어레이 발현과 어레이 CGH 복사체 수 데이터는 mRNA 수준과 CHEK1의 게놈 복사체 간의 양호한 상관관계를 보여준다(도 26b). 그럼에도 불구하고, 웨스턴 블랏에 의하면, SK-MEL-2 세포들은 더 낮은 수준의 CHEK1 단백질을 발현하지 않는다(도 26c). 유사하게, SK-MEL-2 세포들에서 CHEK1의 과다발현은 CHEK1 저해제인 AZD7762에 저항성을 부여하지 않는다(도

26d). 이러한 결과에서 CHEK1의 원발성 발현 조절은 전사후 사건이며, CHEK1 좌위에서 이형접합성 상실은 CHEK1 단백질의 발현을 상당히 감소시키는데 불충분하다고 할 수 있다.

[0284] * * *

[0285] 공개되고 청구된 모든 방법은 본 내용에 근거하여 과도한 실험없이 이루어지고 실행될 수 있다. 본 발명의 조성물과 방법은 바람직한 구체예를 통하여 설명되지만, 당업자는 본 발명의 개념, 사상 및 범위를 벗어나지 않고 설명된 방법, 방법의 단계 또는 방법의 순서를 변화시킬 수 있음이 당업자에게는 자명할 것이다. 좀더 구체적으로, 본 명세서에서 설명된 물질을 동일한 또는 유사한 결과를 얻을 수 있는 화학적으로 생리학적으로 관련된 특정 물질로 대체할 수 있음은 명백하다. 당업자에게 자명한 이러한 모든 유사한 치환 및 변형은 첨부된 청구범위에서 한정된 바와 같은 본 발명의 사상, 범위 및 개념 안에 속한다.

[0286] **참고자료**

[0287] 다음 참고자료는 본 명세서에 기술된 내용을 보충하는 예시적 절차 또는 기타 세부 내용을 제공하는 한 참조함으로써 본 명세서에 특정적으로 포함된다:

U.S. Patent 5,279,721
 U.S. Patent Publ. US 2003/0013656
 U.S. Patent Publ. US 2003/0013657
 U.S. Patent Publ. US 2003/0013846
 U.S. Patent Publ. US 2003/0013847

Abaza *et al.* M phase phosphoprotein 1 is a human plus-end-directed kinesin-related protein required for cytokinesis. *J. Biol. Chem.* 278, 27844-27852, (2003).
 Abbondanzo *et al.*, *Breast Cancer Res. Treat.*, 16:182(151), 1990.
 Allred *et al.*, *Breast Cancer Res. Treat.*, 16:182(149), 1990.
 Anderson *et al.*, *Biochemistry*, 23:2779-2786, 1984.
 Anderson, V. E., Weiss, P. M. & Cleland, W. W. Reaction intermediate analogues for enolase. *Biochemistry* 23, 2779-2786 (1984).
 Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1996.
 Ausubel *et al.*, *In: Current Protocols in Molecular Biology*, John, Wiley & Sons, Inc, New York, 1998.
 Bagchi, A. & Mills, A. A. The quest for the 1p36 tumor suppressor. *Cancer Res.* 68, 2551-2556, (2008).
 Bakhshi *et al.*, *Cell*, 41(3):899-906, 1985.
 Bignell *et al.*, *Nature*, 463:893-898, 2010.
 Brookfield, Genetic redundancy. *Adv Genet* 36, 137-155 (1997).
 Brown *et al.* *Immunol. Ser.*, 53:69-82, 1990.
 Bulteau *et al.* Reversible redox-dependent modulation of mitochondrial aconitase and proteolytic activity during in vivo cardiac ischemia/reperfusion *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 April 26; 102(17): 5987-5991.
 Buszczak *et al.* The carnegie protein trap library: a versatile tool for Drosophila developmental studies. *Genetics* 175, 1505-1531, (2007).

[0288]

- Cancer Genome Atlas Research Network, In: *Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. Nature*, 455:1061-1068, 2008.
- Chen *et al.* Serum and urine metabolite profiling reveals potential biomarkers of human hepatocellular carcinoma. *Molecular and cellular proteomics* 10: M110.004945
- Cho *et al.*, Dephosphorylation of 2,3-bisphosphoglycerate by MIPP expands the regulatory capacity of the Rapoport-Luebering glycolytic shunt. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 5998-6003, (2008).
- Clarke *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.* 415: 229–234, 2003.
- Cleary and Sklar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82(21):7439-7443, 1985.
- Cleary *et al.*, *J. Exp. Med.*, 164(1):315-320, 1986.
- Comi *et al.*, *Ann. Neurol.*, 50:202-207, 2001.
- Costanzo *et al.*, The genetic landscape of a cell. *Science*, 327:425-431, 2008.
- Cox *et al.* A survey of homozygous deletions in human cancer genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 4542-4547, (2005).
- de, A. S. N. M. V. *et al.* Structural flexibility in Trypanosoma brucei enolase revealed by X-ray crystallography and molecular dynamics. *FEBS J.* 274, 5077-5089, (2007).
- De Jager *et al.*, *Semin. Nucl. Med.*, 23(2):165-179, 1993.
- DeLuna *et al.* Exposing the fitness contribution of duplicated genes. *Nat. Genet.* 40, 676-681, (2008).
- De Soto *et al.*, PARP-1 inhibitors: are they the long-sought genetically specific drugs for BRCA1/2-associated breast cancers? *Int J Med Sci* 3, 117-123 (2006).
- Deutscher *et al.*, *Nat. Genet.*, 38:993-998, 2006.
- Design of Prodrugs* (ed. H. Bundgaard), Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, 1985.
- Doolittle and Ben-Zeev, *Methods Mol. Biol.*, 109:215-237, 1999.
- Druker, Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. *Blood* 112, 4808-4817, (2008).
- Duncan, C. G. *et al.* Integrated genomic analyses identify ERRF1 and TACC3 as glioblastoma-targeted genes. *Oncotarget* 1, 265-277 (2010).
- Guha PARP inhibitors stumble in breast cancer. *Nat. Biotechnol.* 29, 373-374, (2011).
- Guha-Chowdhury *et al.*, Inhibition of purified enolases from oral bacteria by fluoride. *Oral Microbiol. Immunol.* 12, 91-97 (1997).
- Gulbis and Galand, *Hum. Pathol.* 24(12), 1271-1285, 1993.
- Henrich *et al.* CAMTA1, a 1p36 tumor suppressor candidate, inhibits growth and activates differentiation programs in neuroblastoma cells. *Cancer Res.* 71, 3142-3151, (2011).

[0289]

- Hill *et al.*, The Rab6-binding kinesin, Rab6-KIFL, is required for cytokinesis. *EMBO J.* 19, 5711-5719 (2000).
- Huttunen *et al.*, *Pharmacol. Rev.*, 63(3):750-71, 2011.
- Hsieh *et al.*, *Curr. Pharm. Des.*, 15(19):2236-50, 2009.
- Joseph *et al.*, Enolase activity and isoenzyme distribution in human brain regions and tumors. *J. Neurochem.* 66, 2484-2490 (1996).
- Keller *et al.*, Halofuginone and other febrifugine derivatives inhibit prolyl-tRNA synthetase. *Nat. Chem. Biol.* 8(3):311-7, 2012.
- Kerr *et al.*, *Br. J. Cancer*, 26(4):239-257, 1972.
- Kobayakawa *et al.*, *Nature*, 450:503-508, 2007.
- Kotliarov, Y. *et al.* High-resolution global genomic survey of 178 gliomas reveals novel regions of copy number alteration and allelic imbalances. *Cancer Res* 66, 9428-9436, (2006).
- Law Perfusion and MRS for brain tumor diagnosis. *Clinical MR*. Chapter 43: 1215-1243.
- Leonardi *et al.*, Pantothenate kinase 1 is required to support the metabolic transition from the fed to the fasted state. *PLoS One* 5, e11107, (2010a).
- Leonardi *et al.* Modulation of pantothenate kinase 3 activity by small molecules that interact with the substrate/allosteric regulatory domain. *Chem. Biol.* 17, 892-902, (2010b).
- Leonardi *et al.* Activation of human mitochondrial pantothenate kinase 2 by palmitoylcarnitine *PNAS* 2007: 1494-1499.
- Maser *et al.* Chromosomally unstable mouse tumours have genomic alterations similar to diverse human cancers. *Nature* 447, 966-971, (2007).
- Moller-Hartmann *et al.* Clinical application of proton magnetic resonance spectroscopy in the diagnosis of intracranial mass lesions. *Neuroradiology* 44: 371-381
- Moore *et al.*, Double or nothing: a Drosophila mutation affecting meiotic chromosome segregation in both females and males. *Genetics* 136, 953-964 (1994).
- Mueller *et al.*, *Oncogene*, 26:583-593, 2007.
- Nakamura *et al.*, In: *Handbook of Experimental Immunology* (4th Ed.), Weir *et al.* (Eds.), 1:27, Blackwell Scientific Publ., Oxford, 1987.
- Navarro *et al.*, *FEBS J.*, 274:5077-5089, 2007.
- Nelson Multivoxel Magnetic Resonance Spectroscopy of brain tumors. *Molecular Cancer Therapeutics* 2, 497-507
- Nijhawan *et al.*, *Cell*, 150:842-854, 2012.

[0290]

- Odunsi Detection of epithelial ovarian cancer using ¹H-NMR-based metabolomics. *Int. J. of Cancer* 2005: 782-788.
- Parrish *et al.* Novel ATP-competitive kinesin spindle protein inhibitors. *J. Med. Chem.* 50, 4939-4952, (2007).
- Peng *et al.* Array-based comparative genomic hybridization analysis of high-grade neuroendocrine tumors of the lung. *Cancer Sci.* 96, 661-667, (2005).
- Possemato *et al.* Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer. *Nature* 476, 346-350, (2011).
- Poyner *et al.*, Structure of the bis divalent cation complex with phosphonoacetohydroxamate at the active site of enolase. *Biochemistry* 31, 7166-7173 (1992).
- Raj *et al.* Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS. *Nature* 475, 231-234, (2011).
- Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., 1989.
- Smith *et al.*, Complete loss of iron regulatory proteins 1 and 2 prevents viability of murine zygotes beyond the blastocyst stage of embryonic development. *Blood Cells Mol. Dis.* 36, 283-287, (2006).
- Sonnichsen *et al.* Full-genome RNAi profiling of early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 434, 462-469, (2005).
- Spratlin *et al.* Clinical applications of metabolomics in oncology: a review. *Clinical cancer research* 15: 431-440.
- Stefanini, *Am. J. Clin. Pathol.*, 58:408-414, 1972.
- Stommel *et al.* Coactivation of receptor tyrosine kinases affects the response of tumor cells to targeted therapies. *Science* 318, 287-290, (2007).
- Sundrud *et al.*, Halofuginone inhibits TH17 cell differentiation by activating the amino acid starvation response. *Science*, 324(5932):1334-8, 2009.
- Taniuchi *et al.* Down-regulation of RAB6KIFL/KIF20A, a kinesin involved with membrane trafficking of discs large homologue 5, can attenuate growth of pancreatic cancer cell. *Cancer Res.* 65, 105-112, (2005).
- Taylor *et al.* Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell* 18, 11-22, (2010).
- Tcherniuk *et al.* Relocation of Aurora B and survivin from centromeres to the central spindle impaired by a kinesin-specific MKLP-2 inhibitor. *Angew Chem Int Ed Engl* 49, 8228-8231, (2010).

[0291]

Tonon *et al.* High-resolution genomic profiles of human lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 9625-9630, (2005).

Tsujimoto and Croce, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83(14):5214-5218, 1986.

Tsujimoto *et al.*, *Nature*, 315:340-343, 1985.

Vavouri *et al.*, Widespread conservation of genetic redundancy during a billion years of eukaryotic evolution. *Trends Genet.* 24, 485-488, (2008).

Wise *et al.*, Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. *Trends Biochem. Sci.* 35, 427-433, (2010).

Yin *et al.* High-resolution genomic copy number profiling of glioblastoma multiforme by single nucleotide polymorphism DNA microarray. *Mol. Cancer Res.* 7, 665-677, (2009).

Zhang *et al.* Chemical knockout of pantothenate kinase reveals the metabolic and genetic program responsible for hepatic coenzyme A homeostasis. *Chem. Biol.* 14, 291-302, (2007).

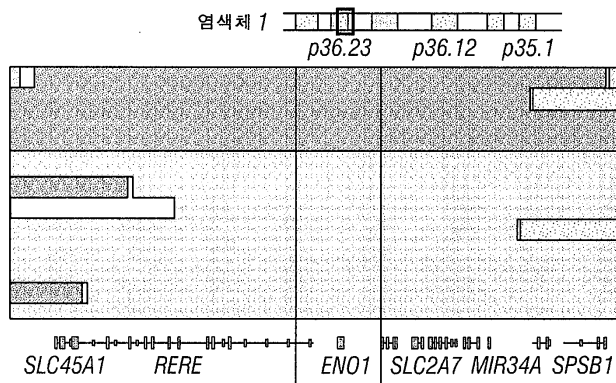
Zheng *et al.*, *Nature*, 455:1129-1133, 2008.

Zhou *et al.* A novel pantothenate kinase gene (PANK2) is defective in Hallervorden-Spatz syndrome. *Nat. Genet.* 28, 345-349, (2001).

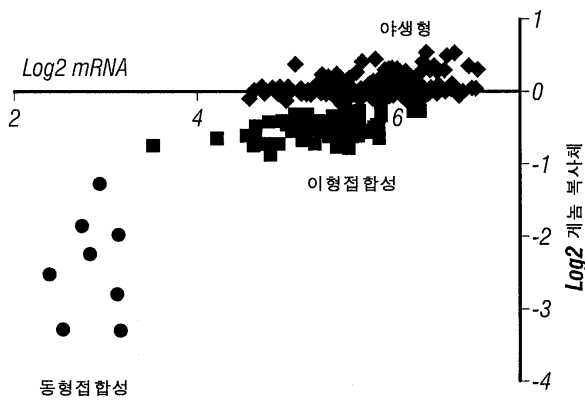
[0292]

도면

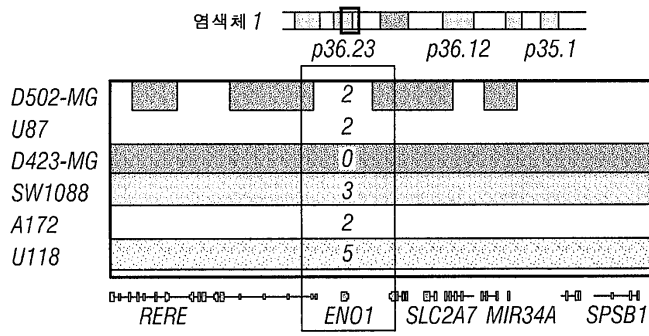
도면1a



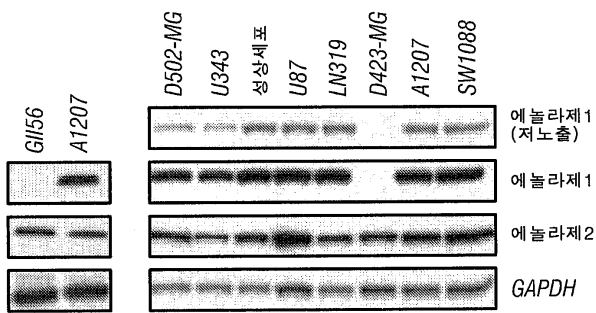
도면1b



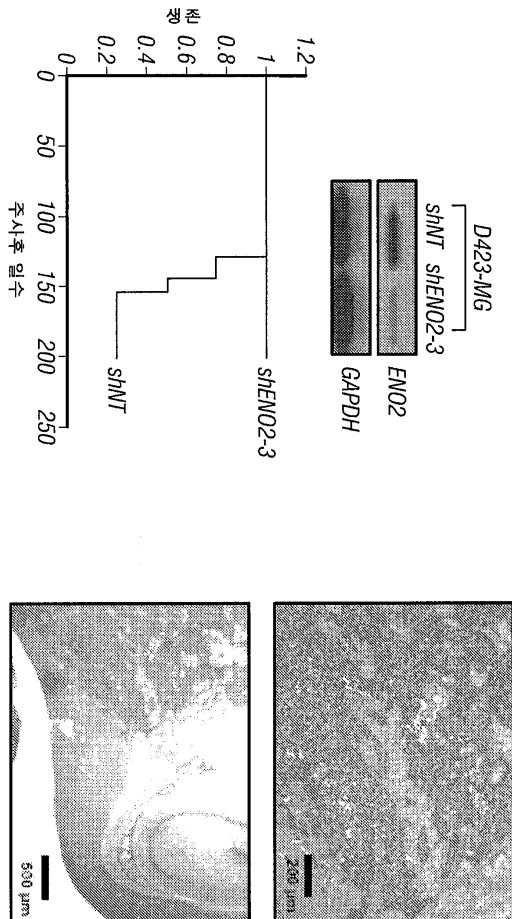
도면1c



도면1d



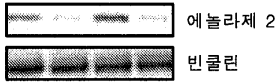
도면1e



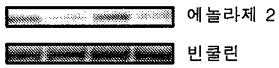
도면2a

-	-	+	+	<i>shENO2-4</i>
+	+	-	-	<i>shENO2-3</i>
-	+	-	+	독시사이클린

D423-MG (*ENO1 null*)



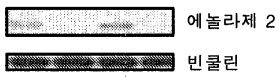
A1207 (*ENO1 WT*)



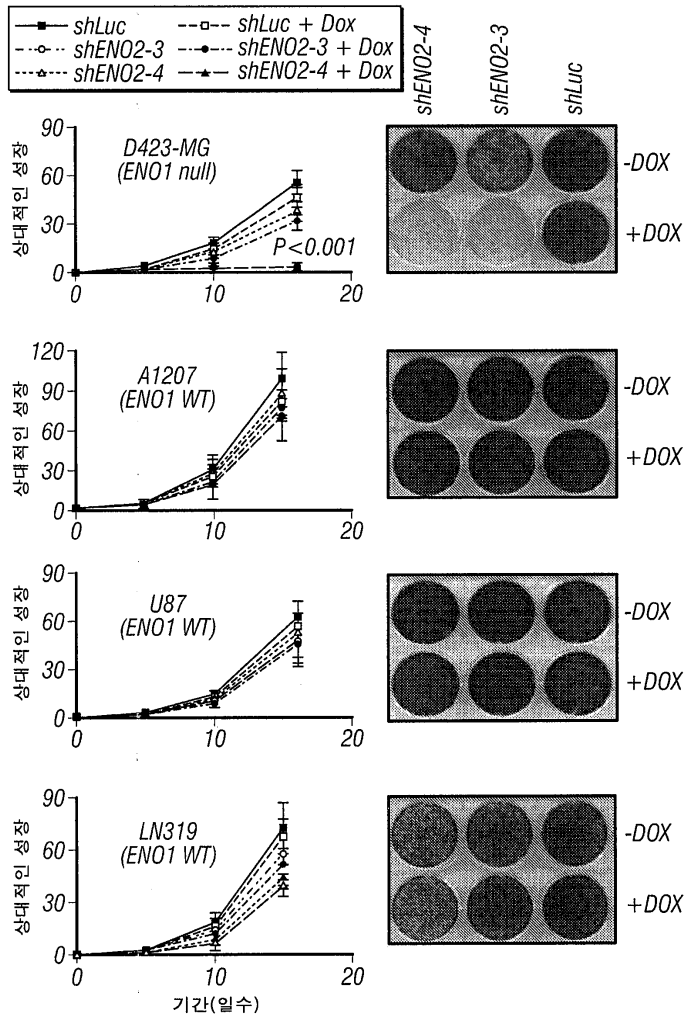
U87 (*ENO1 WT*)



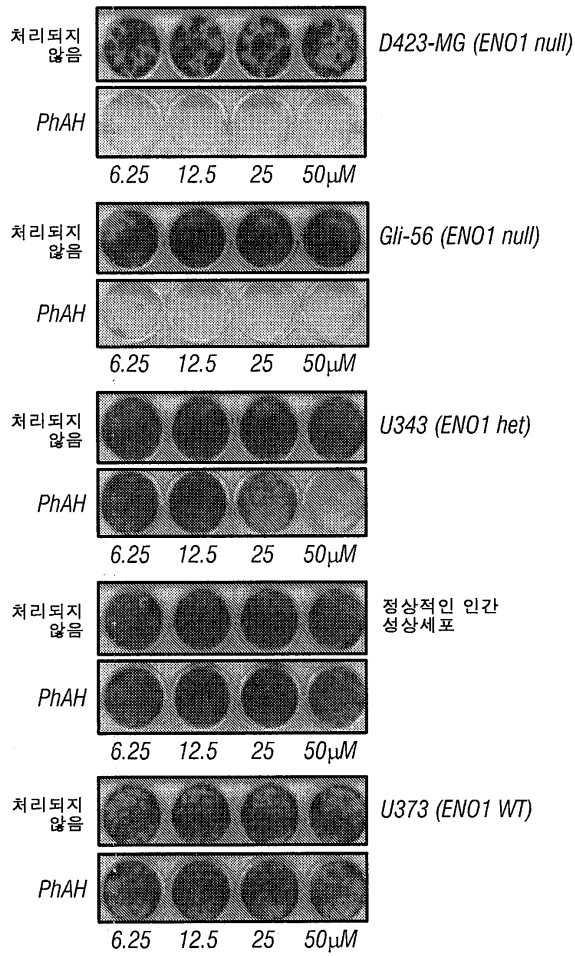
LN319 (*ENO1 WT*)



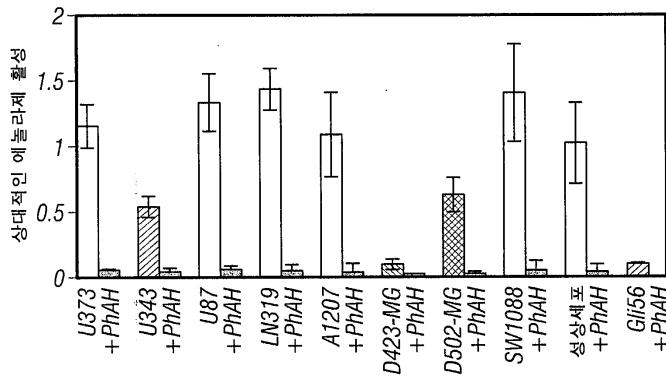
도면2b



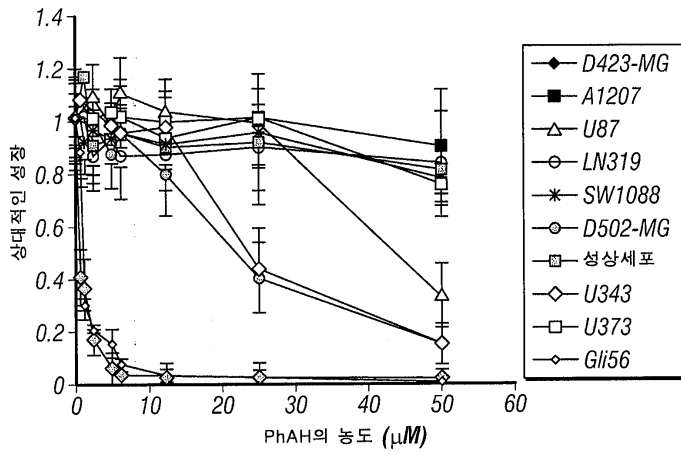
도면3a



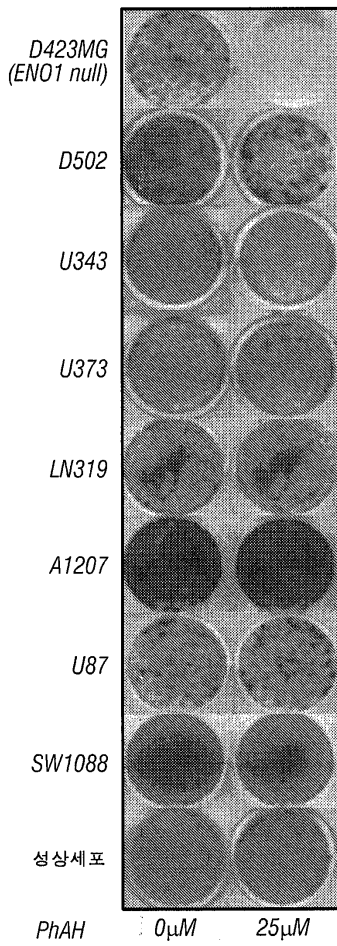
도면3b



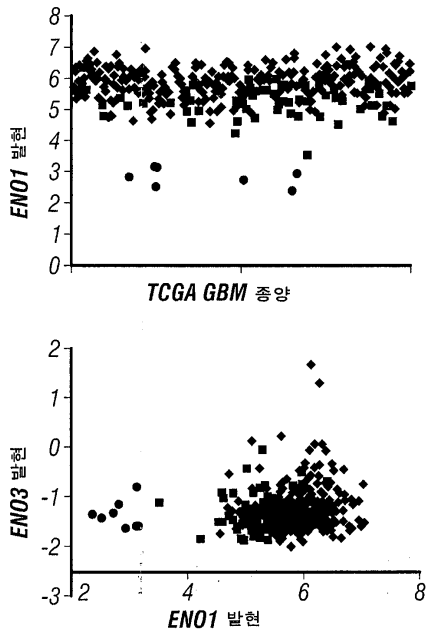
도면3c



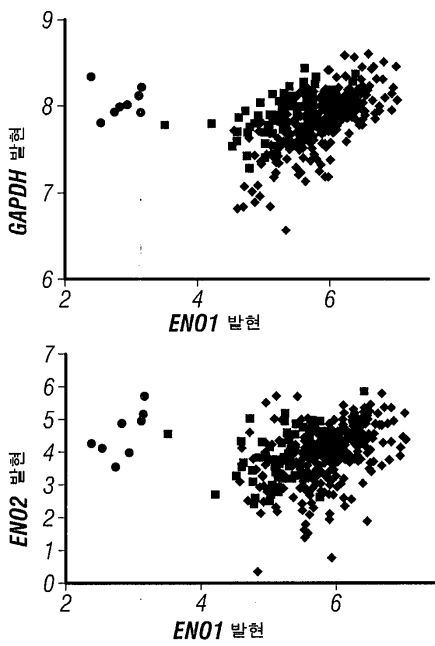
도면3d



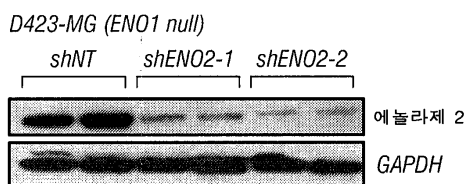
도면4a



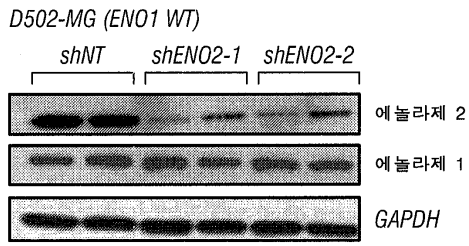
도면4b



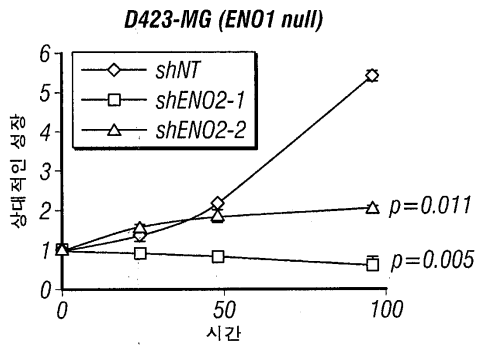
도면5a



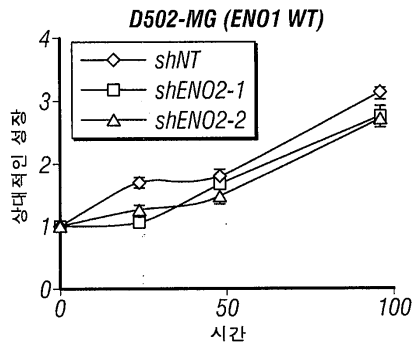
도면5b



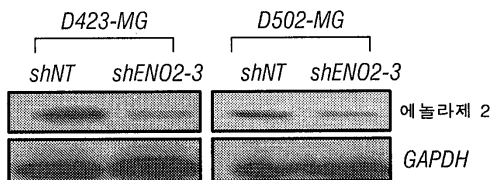
도면5c



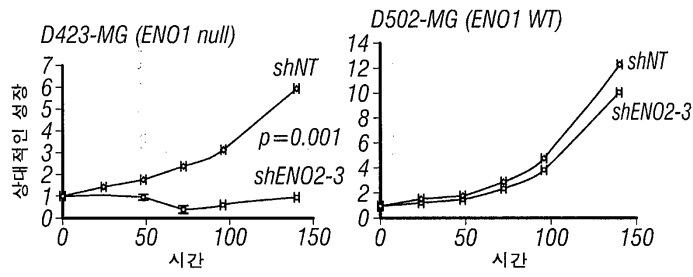
도면5d



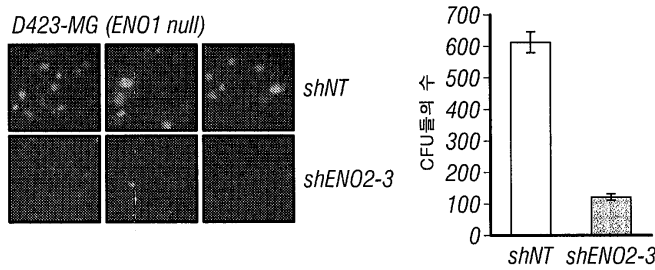
도면6a



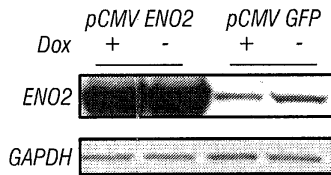
도면6b



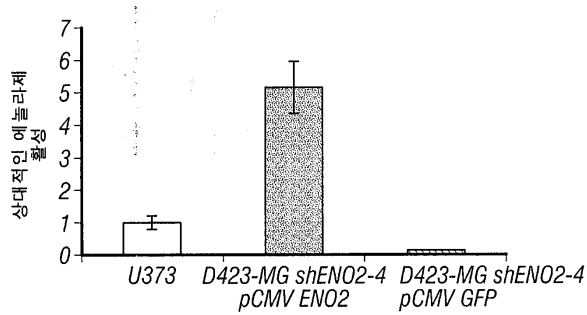
도면6c



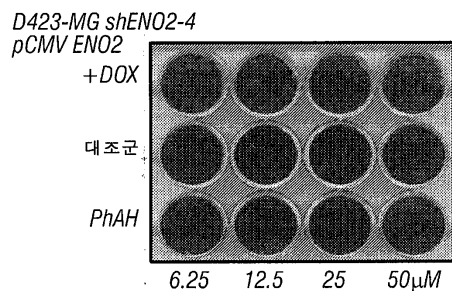
도면7a



도면7b

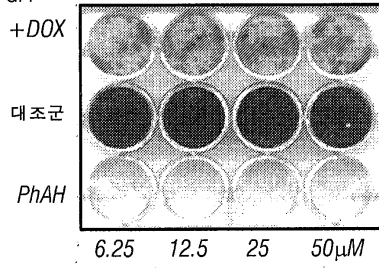


도면7c



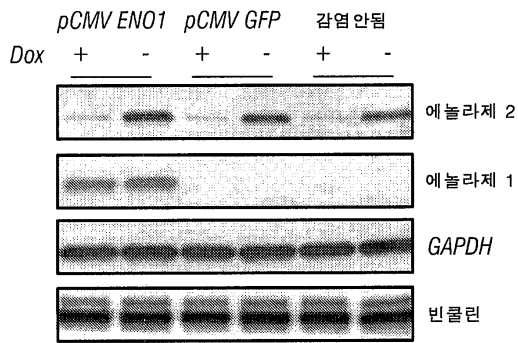
도면7d

D423-MG shENO2-4
pCMV GFP



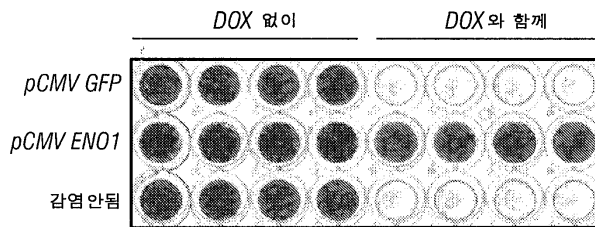
도면8a

D423-MG (ENO1 null) shENO2 3 + 4

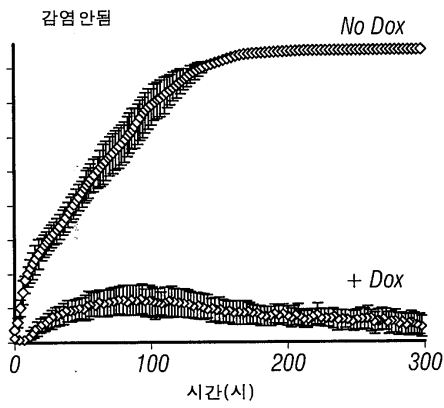
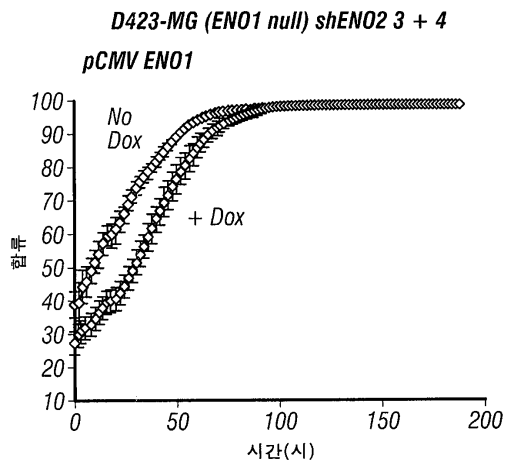


도면8b

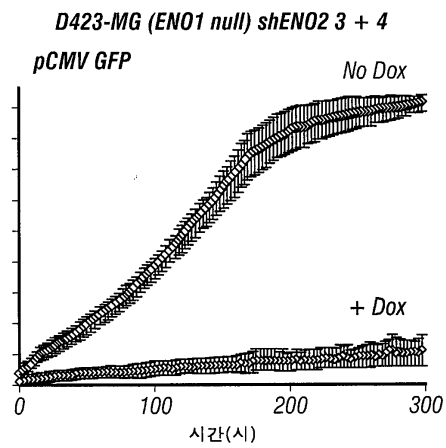
D423-MG (ENO1 null) shENO2 3 + 4



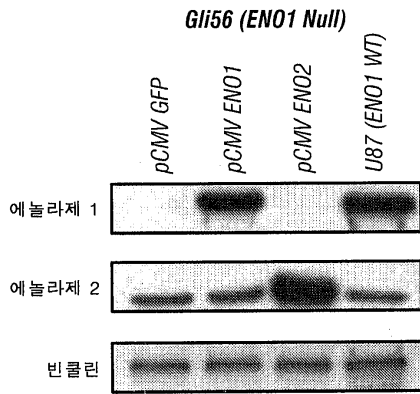
도면8ca



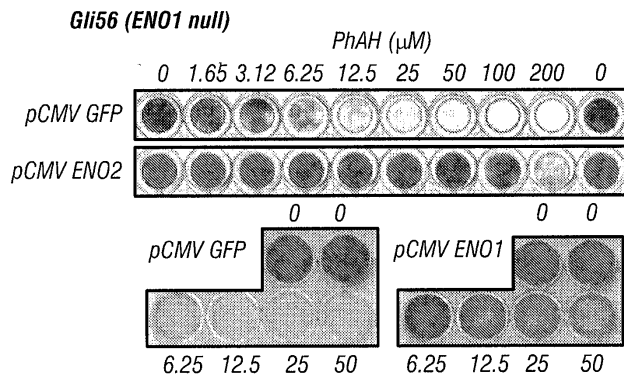
도면8cb



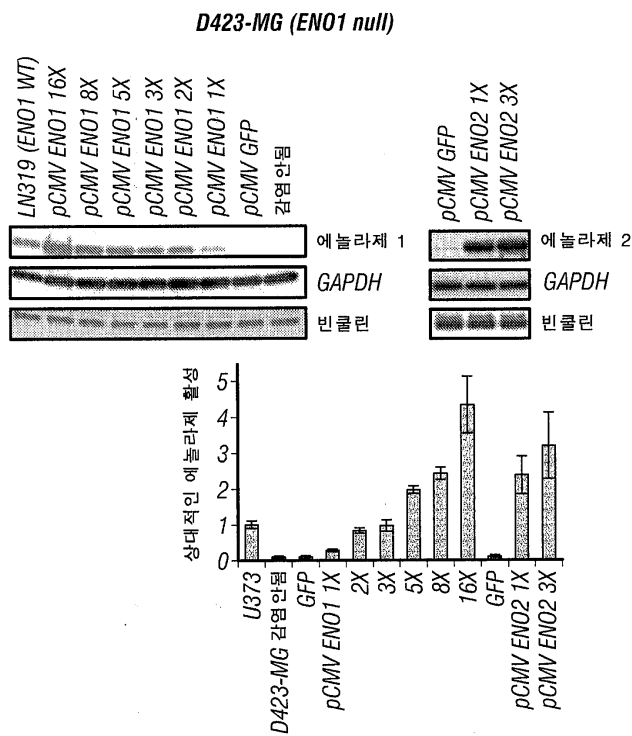
도면9a



도면9b

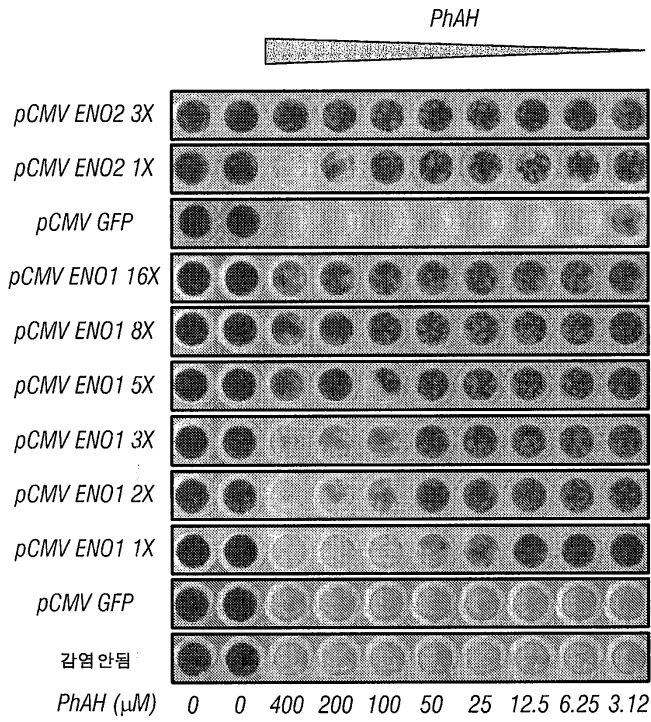


도면9c

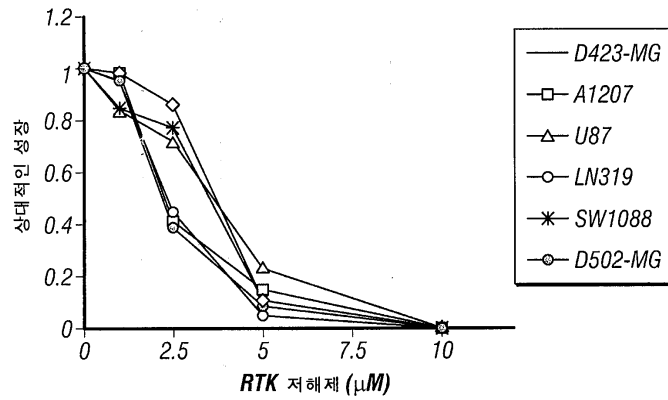


도면9d

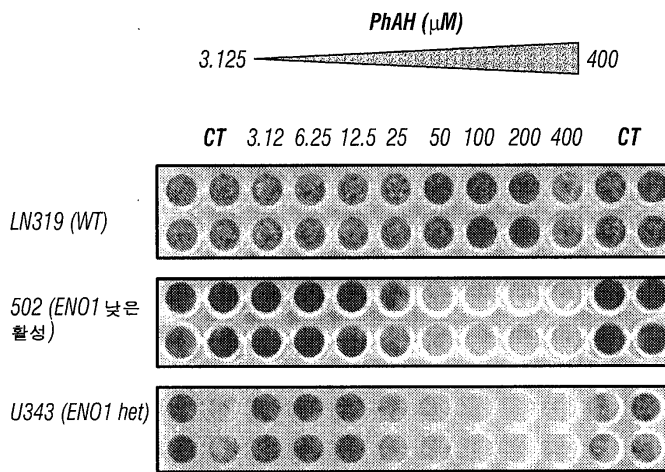
D423-MG (ENO1 null)



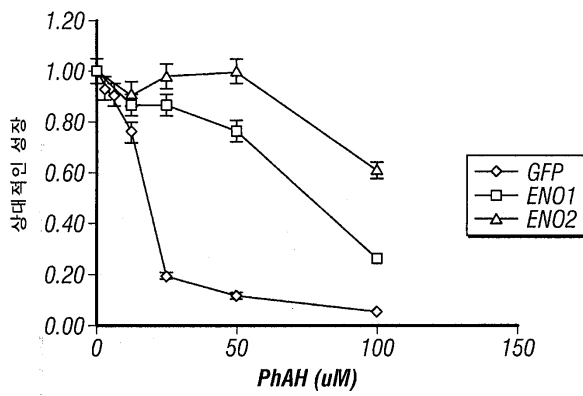
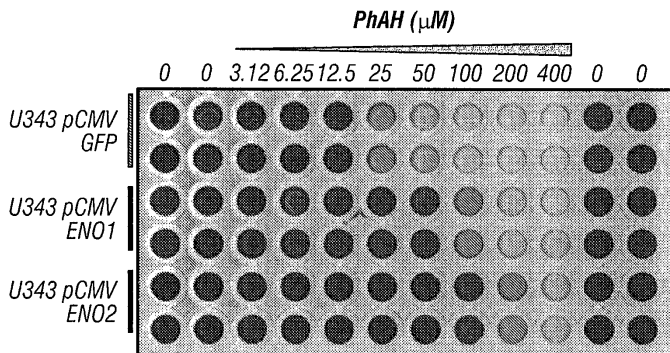
도면10



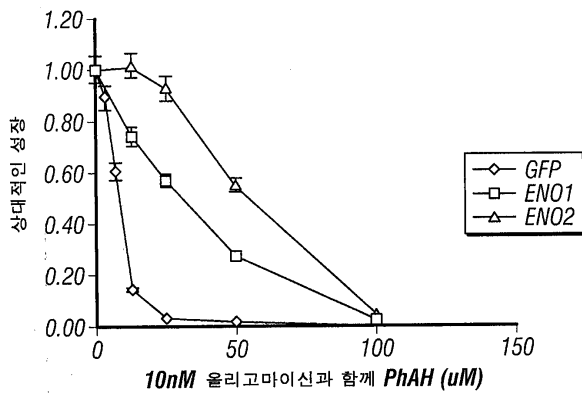
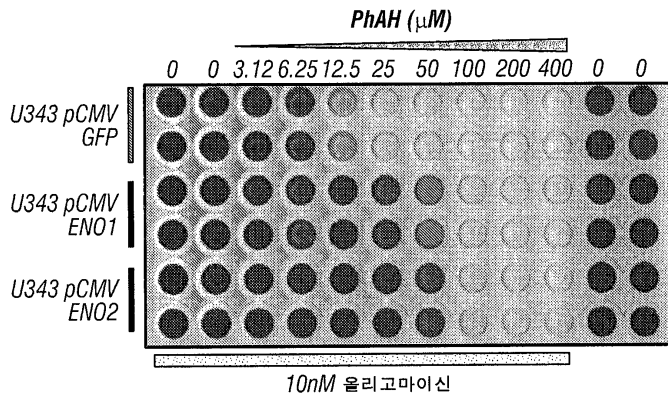
도면11



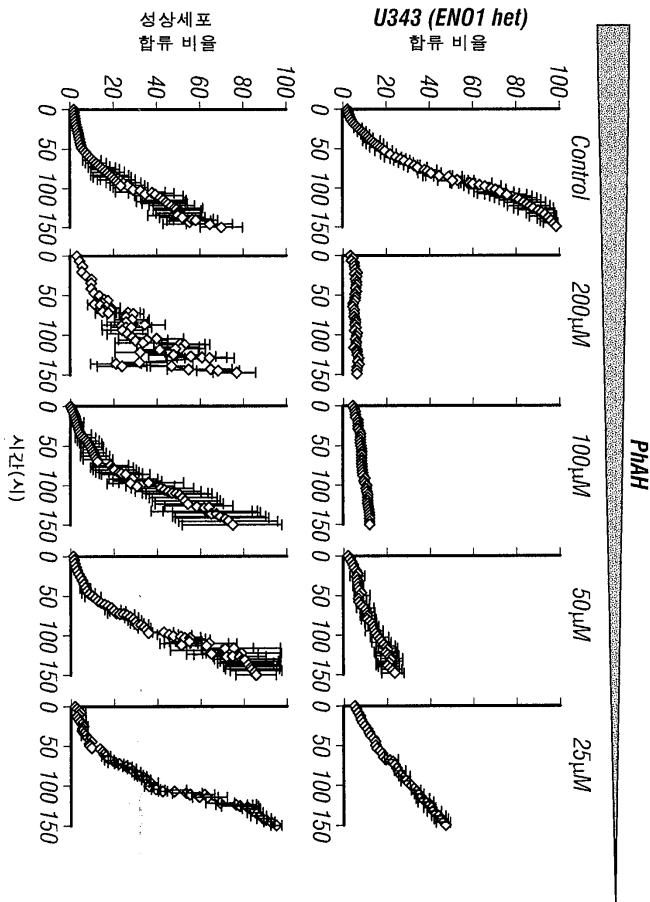
도면12a



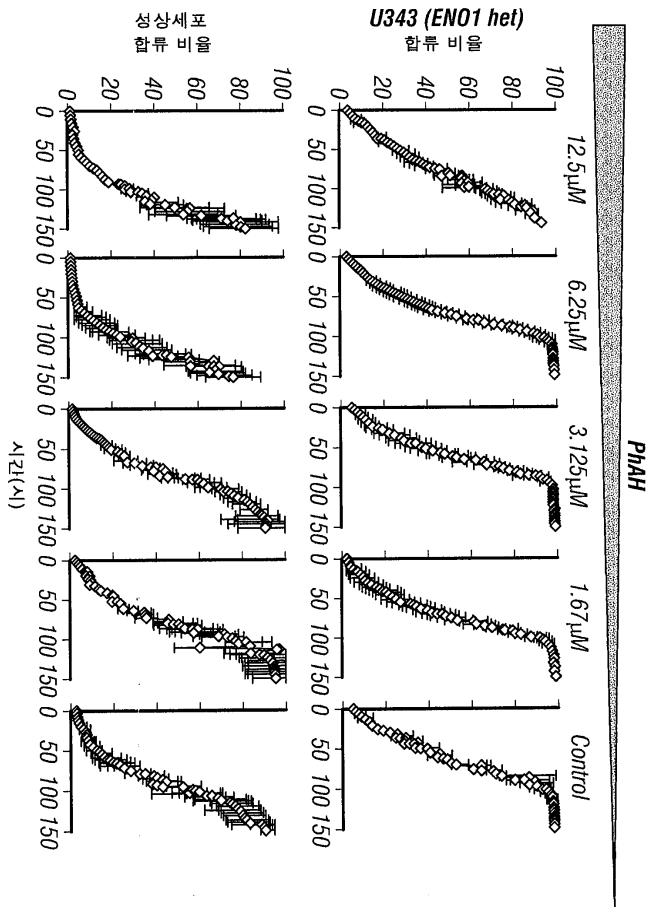
도면12b



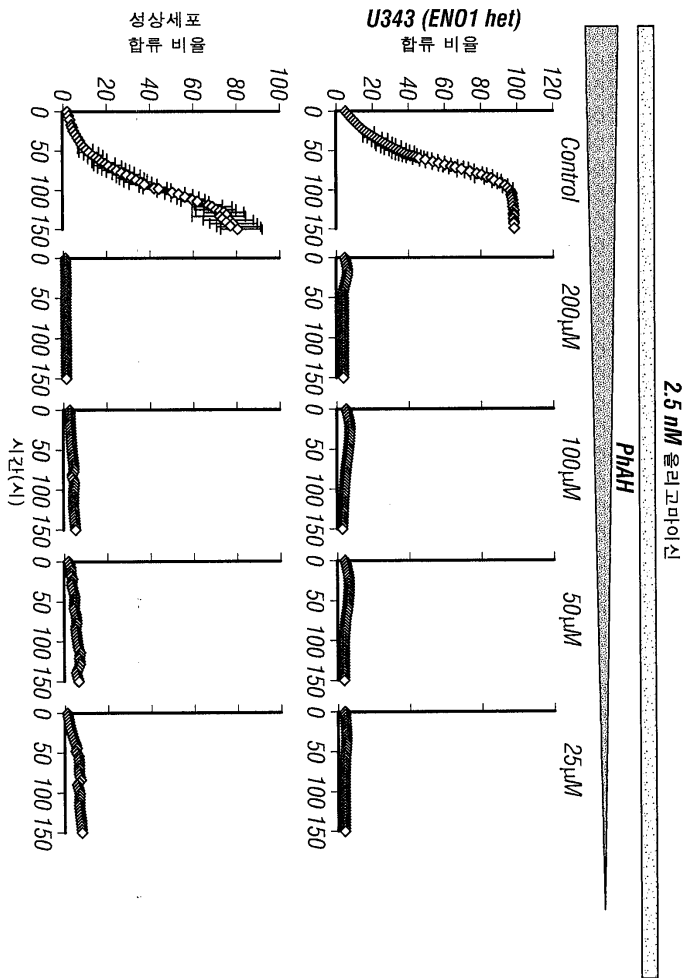
도면13aa



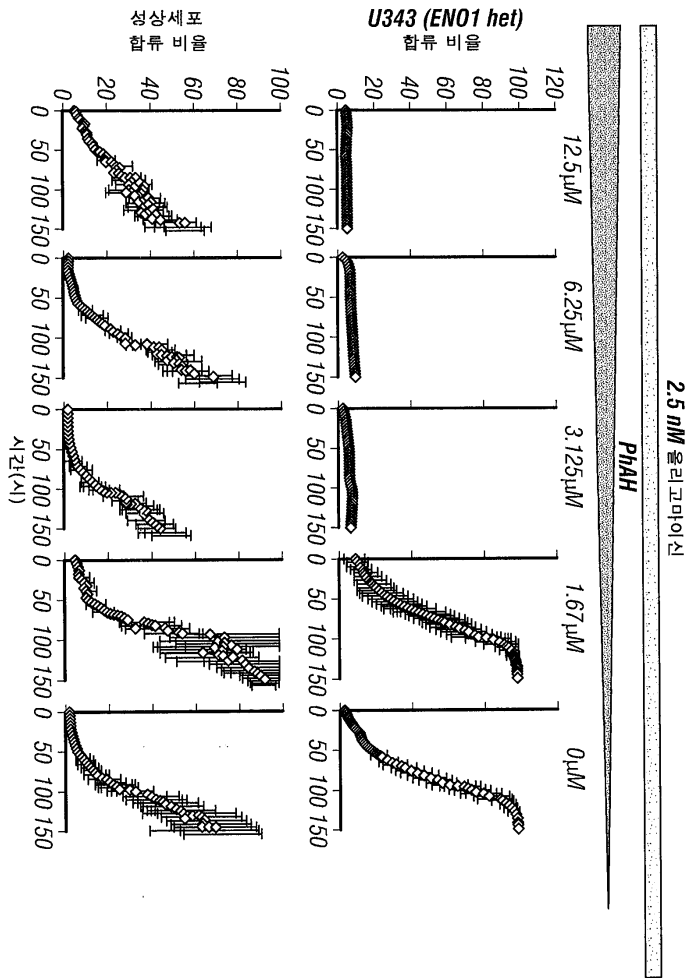
도면13ab



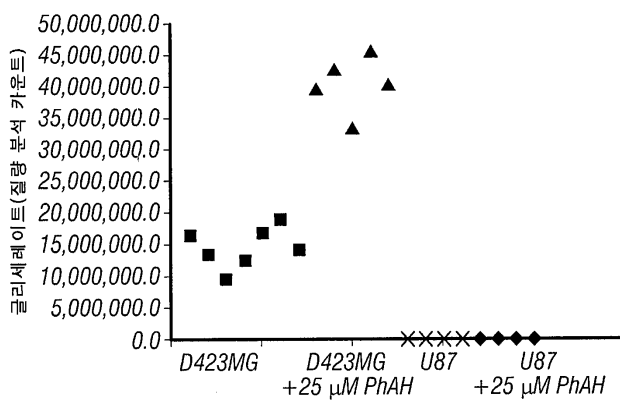
도면13ba



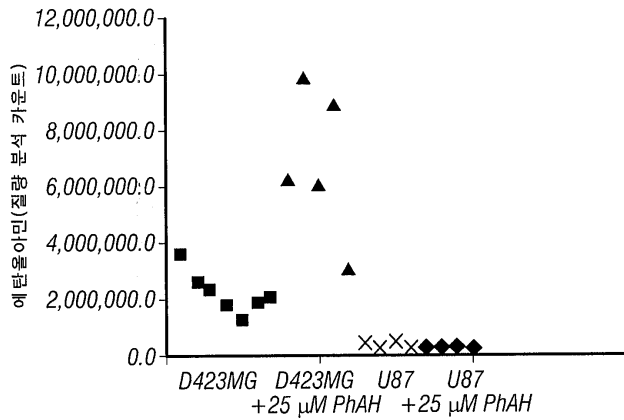
도면13bb



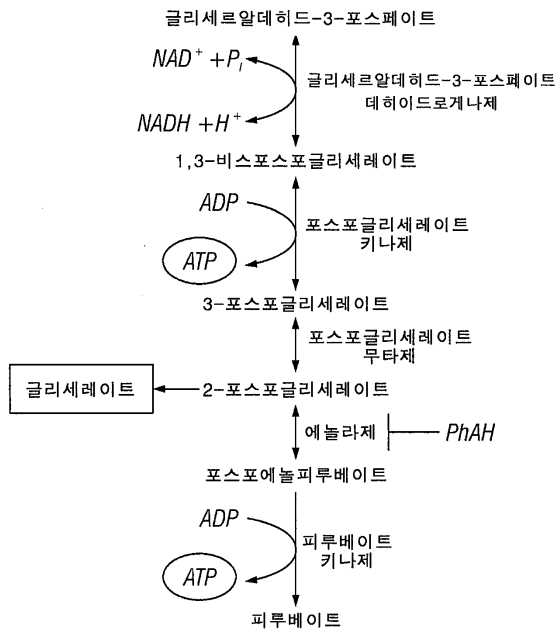
도면14a



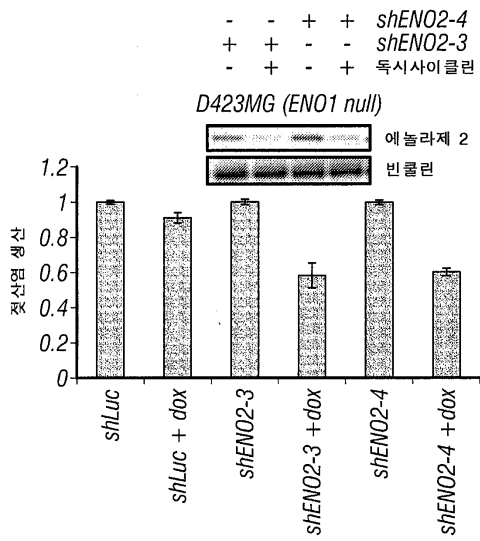
도면14b



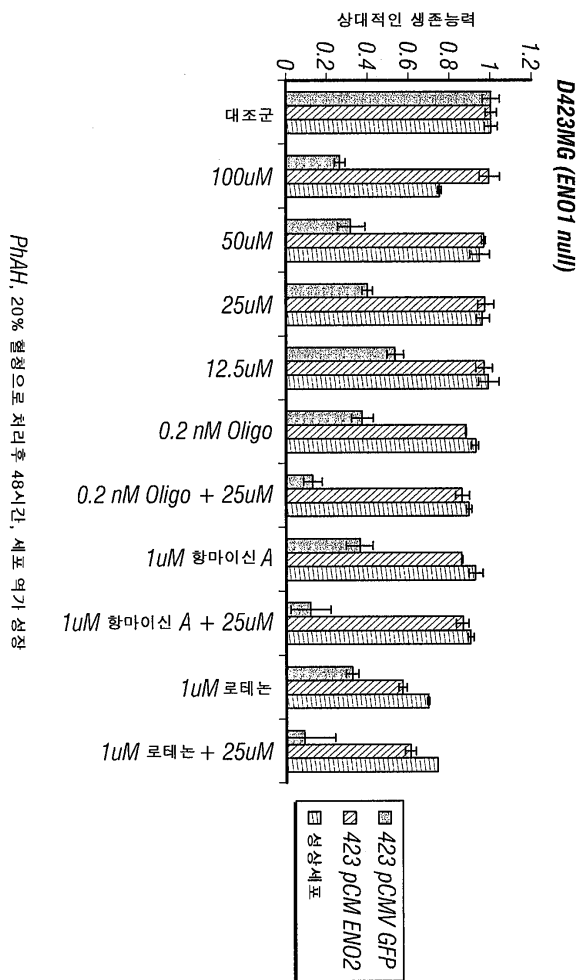
도면14c



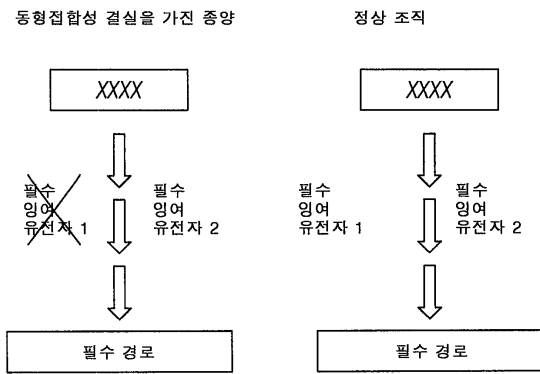
도면14d



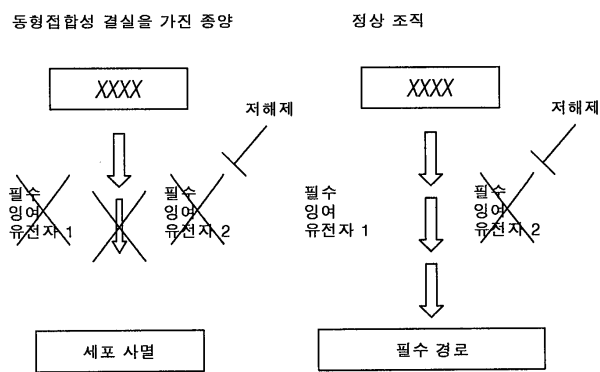
도면15



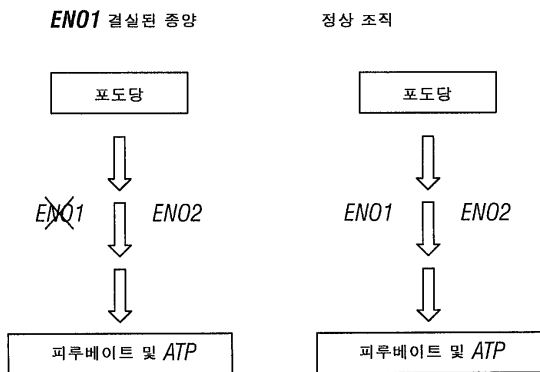
도면16a



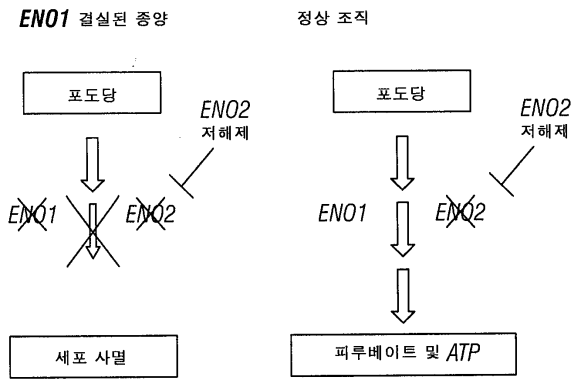
도면16b



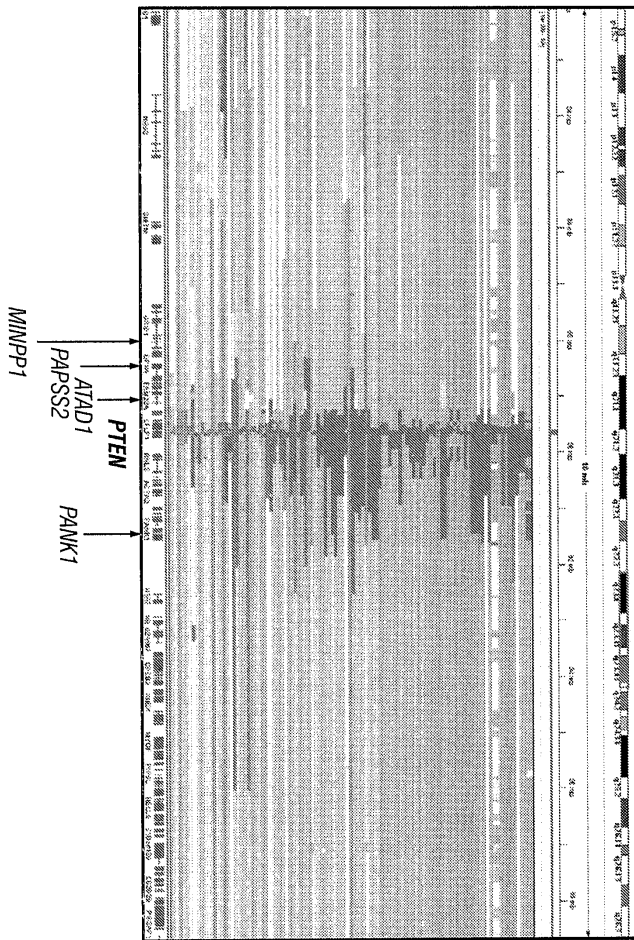
도면16c



도면16d

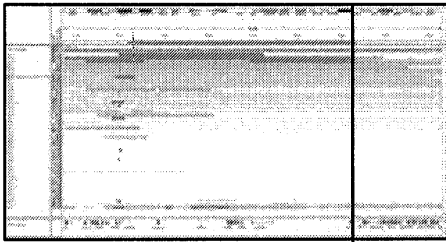


도면17

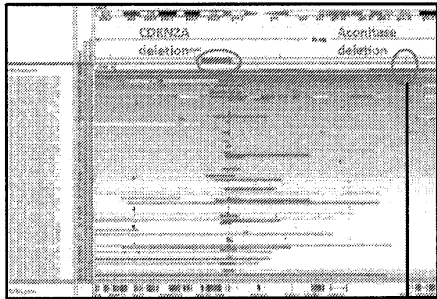


도면18a

멜라노마 데이터세트

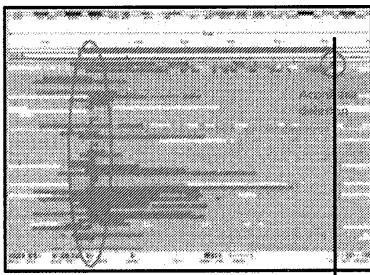


INK1ARF ACO1
 MEO18 log2 ACO1 -1.81 아코니타제 1/IREBP1
 MEO46 log2 ACO1 -1.43



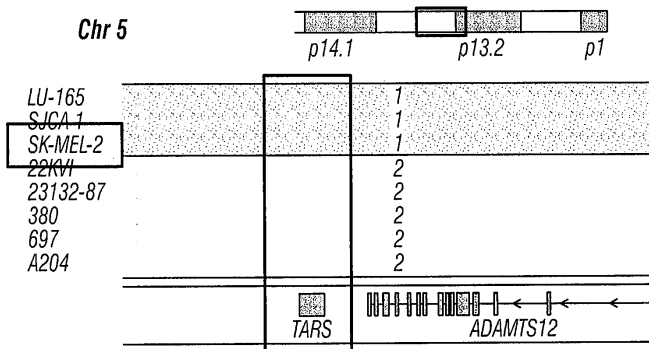
도면18b

GBM 데이터세트

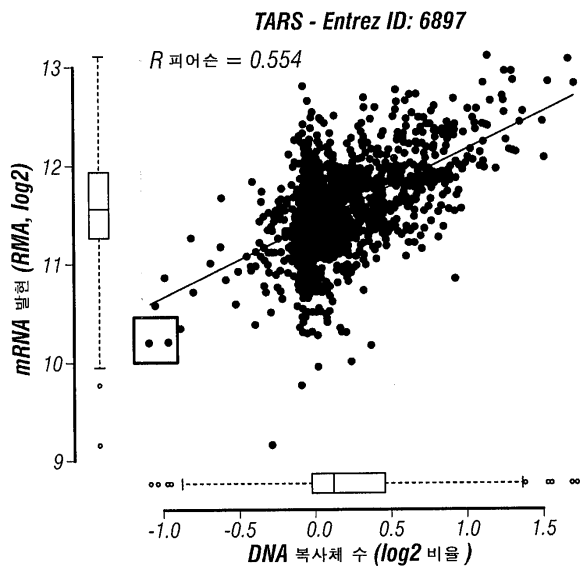


CDKN2A 결실
 06-0127 log2 ACO1 -1.44
 06-1802 log2 ACO1 -1.10

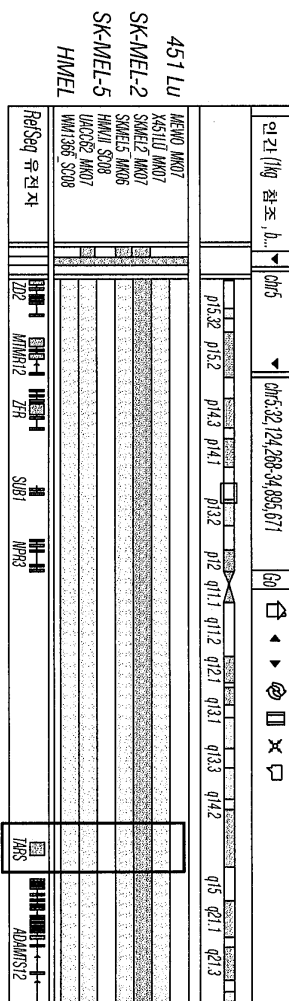
도면19a



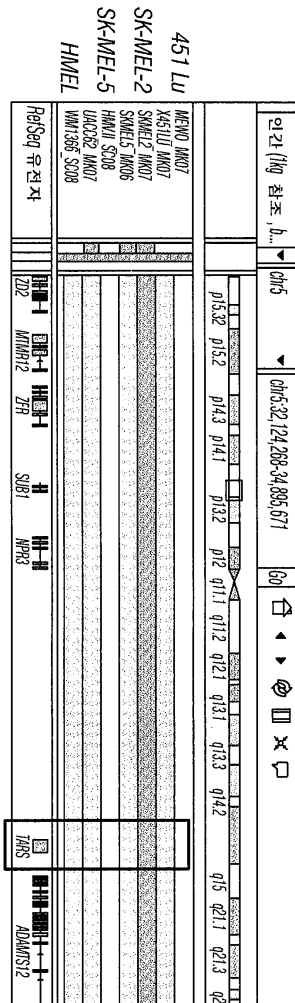
도면19b



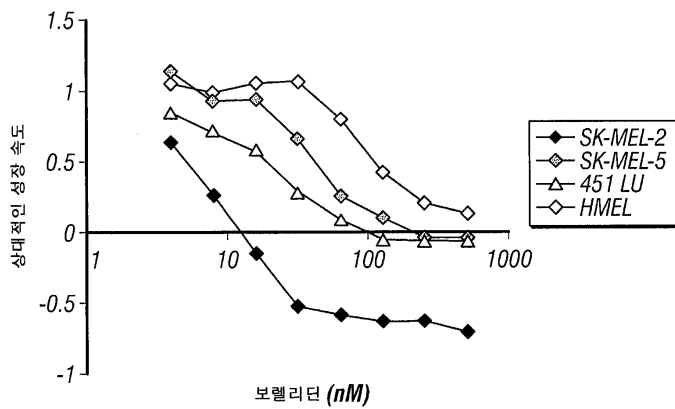
도면19c



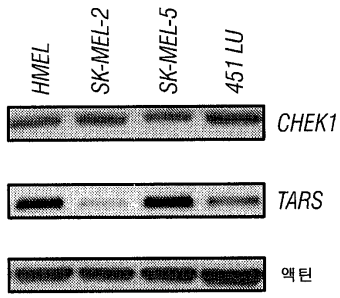
도면20a



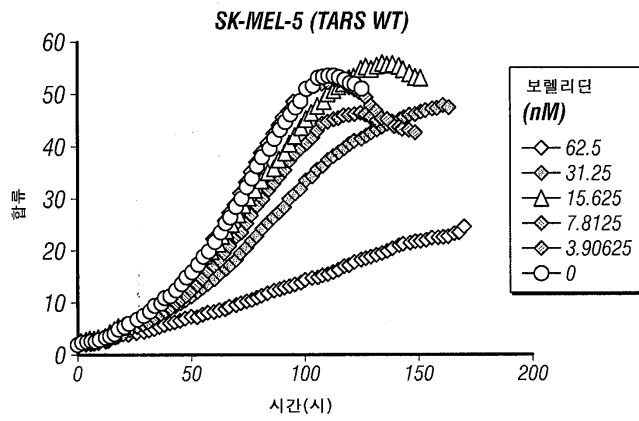
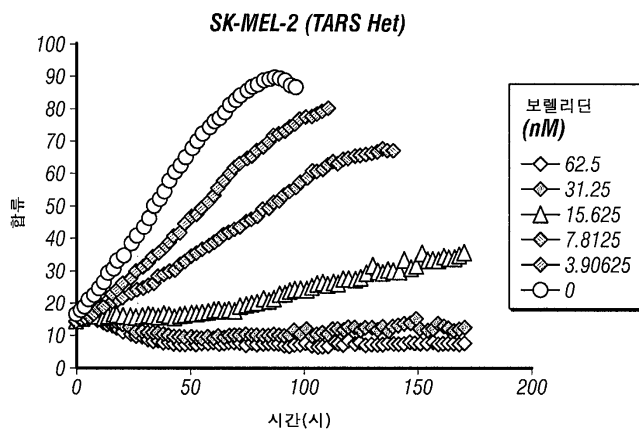
도면20b



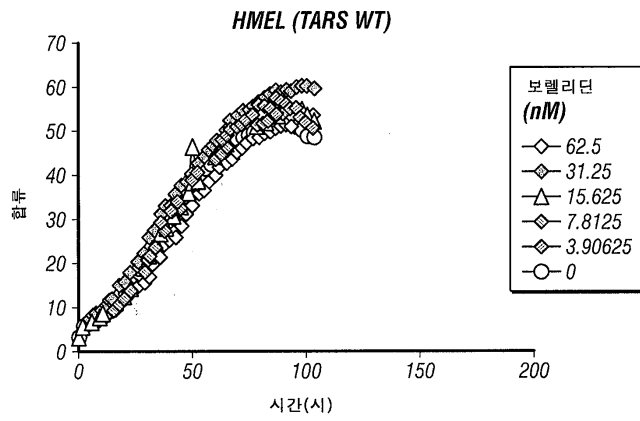
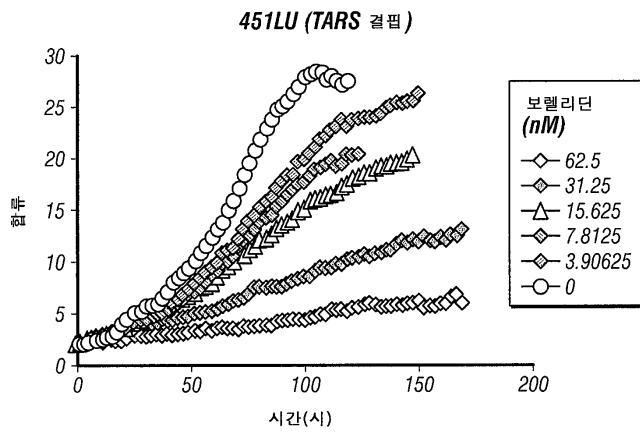
도면20c



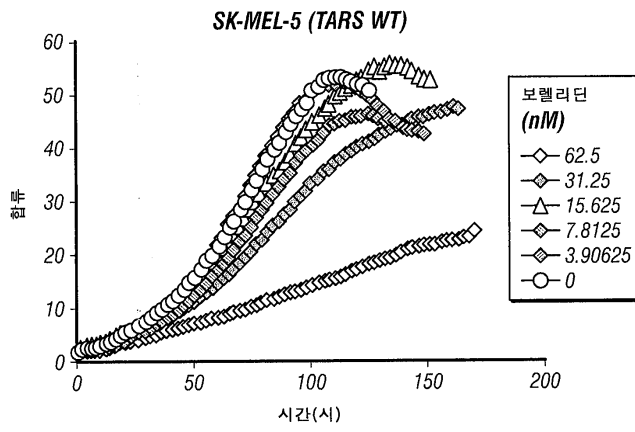
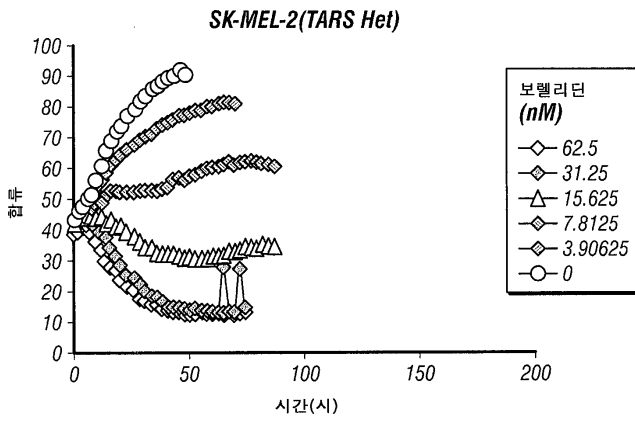
도면21a



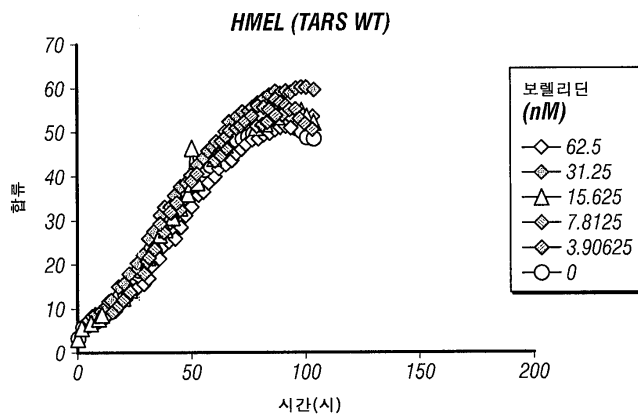
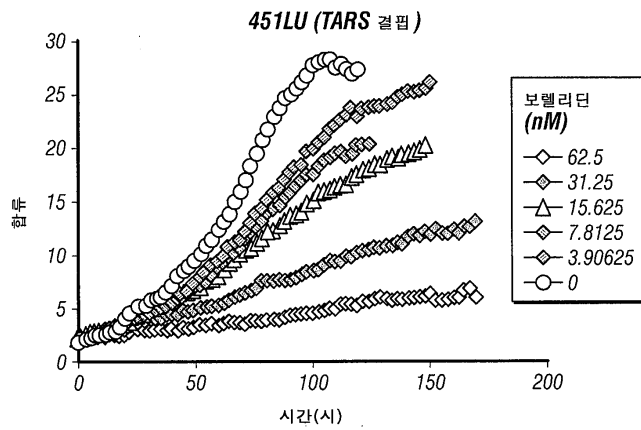
도면21b



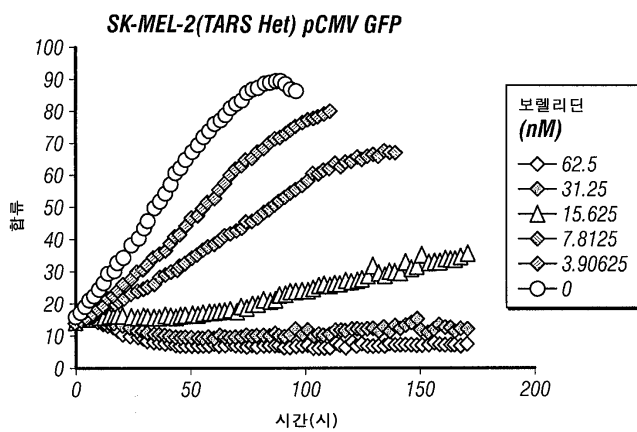
도면22a



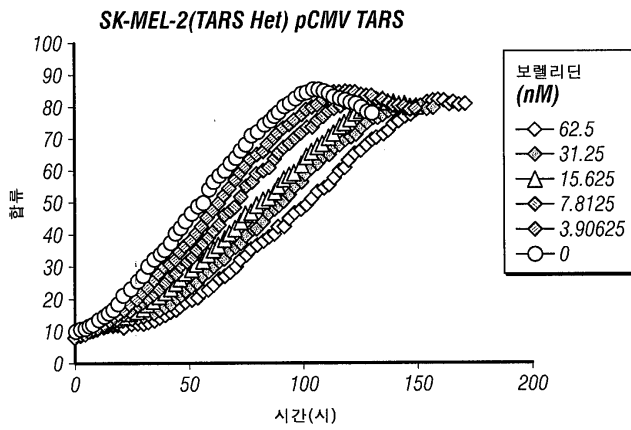
도면22b



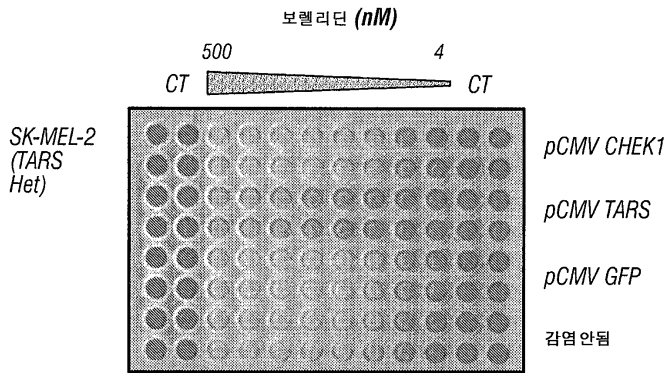
도면23a



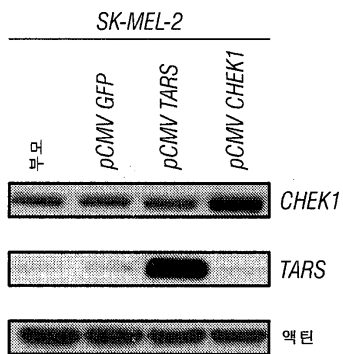
도면23b



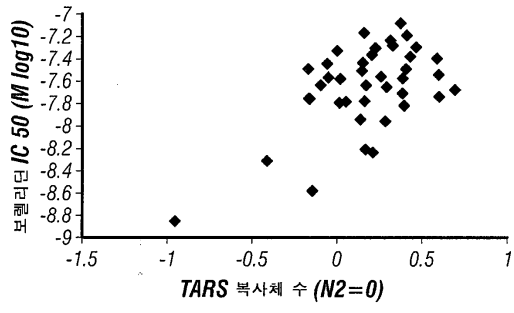
도면23c



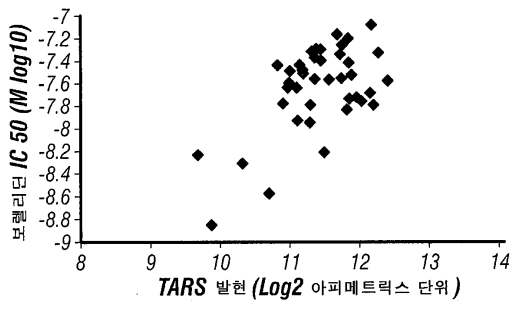
도면23d



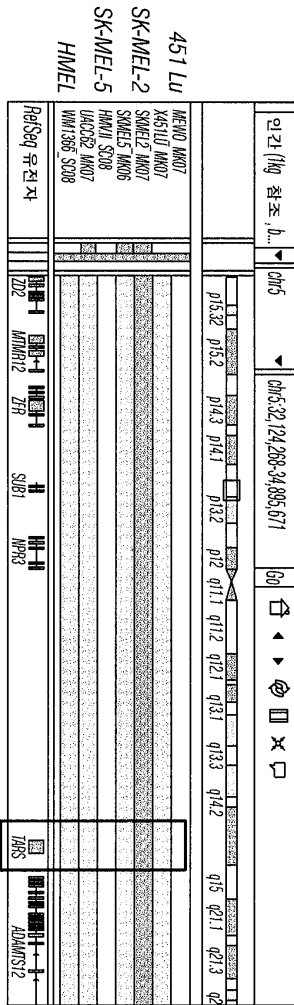
도면24a



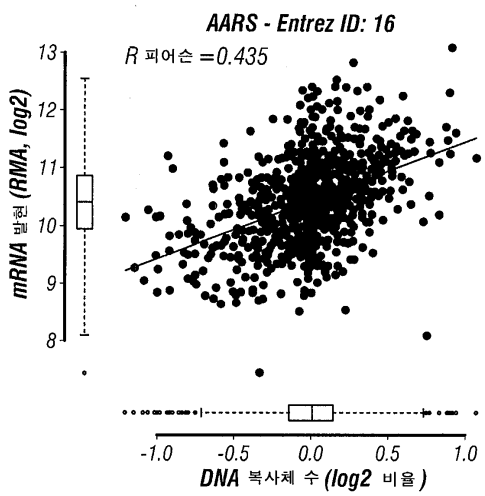
도면24b



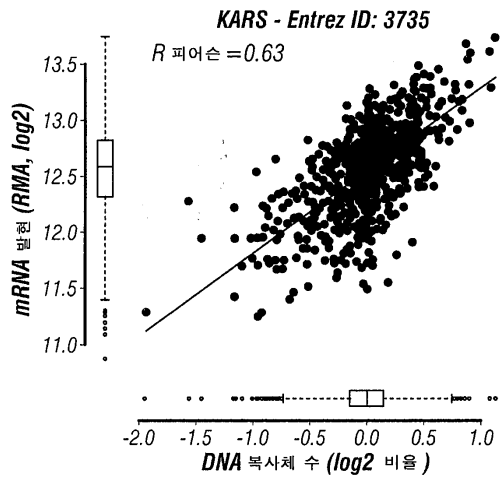
도면24c



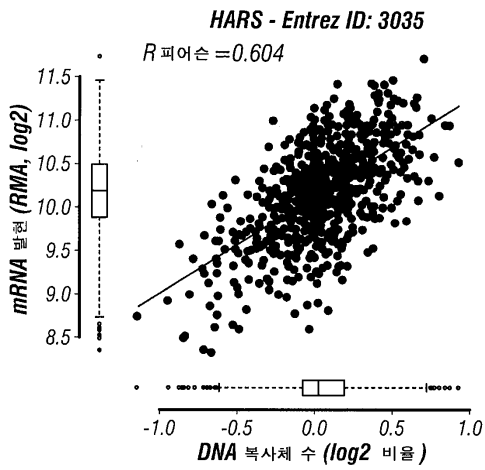
도면25a



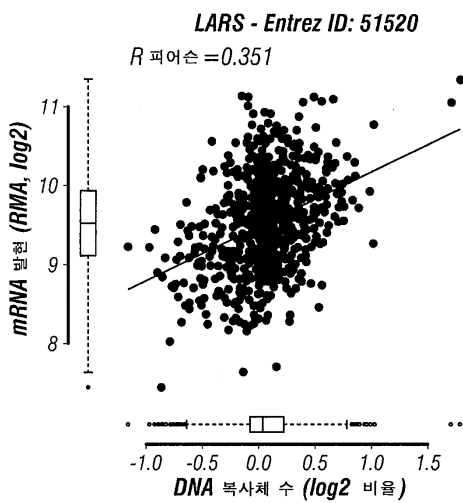
도면25b



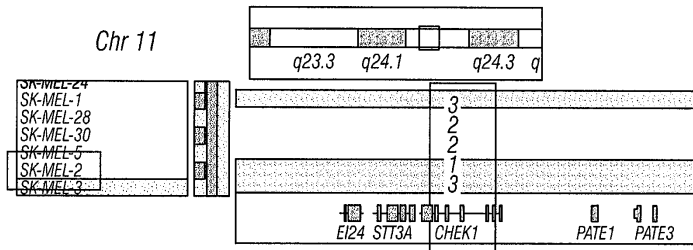
도면25c



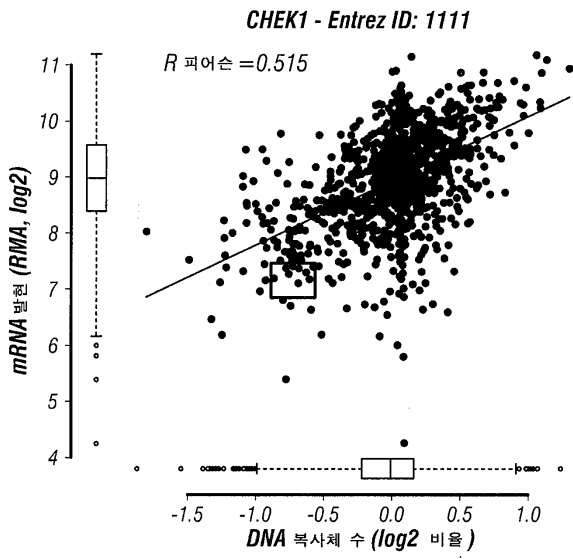
도면25d



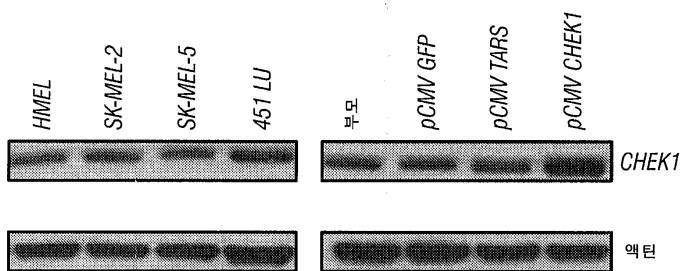
도면26a



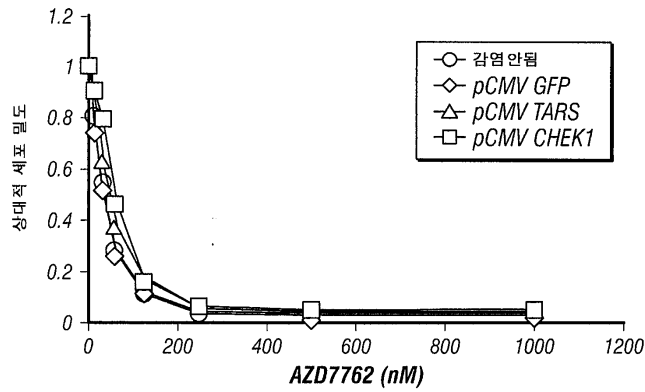
도면26b



도면26c



도면26d



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM;
 DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.

<120> COLLATERAL GENE INACTIVATION BIOMARKERS AND TARGETS FOR CANCER THERAPY

<130> UTFC.P1138WO

<150> US 61/570,366

<151> 2011-12-14

<150> US 61/652,738

<151> 2012-05-29

<160> 4

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic primer

<400> 1

caagggagtc atcaaggaca a

21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic primer
 <400> 2
 cgcttgcta ataaggcttt a 21
 <210> 3
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic primer
 <400> 3
 cggccttcaa cgtgatcaa 19
 <210> 4
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic primer
 <400> 4
 gggactgaga acaaatcc 18