



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0121720
(43) 공개일자 2024년08월09일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/506 (2006.01) A61K 31/4418 (2006.01)
A61K 31/445 (2006.01) A61K 31/4545 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01) A61K 31/53 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/506 (2013.01)
A61K 31/4418 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2024-7016183
- (22) 출원일자(국제) 2022년12월14일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2024년05월16일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2022/081587
- (87) 국제공개번호 WO 2023/114867
국제공개일자 2023년06월22일
- (30) 우선권주장
63/289,943 2021년12월15일 미국(US)

- (71) 출원인
다나-파버 캔서 인스티튜트 인크.
미국 메사추세츠 02215 보스턴 브룩클린 애비뉴 450
- (72) 발명자
압스트롱, 스콧 에이.
미국 메사추세츠 01778 웨일랜드 라이스 로드 233
헤밍, 매튜 엘.
미국 메사추세츠 02215 보스턴 롱우드 애비뉴 360
다나-파버 캔서 인스티튜트 엘씨8216 내
- (74) 대리인
특허법인 무한

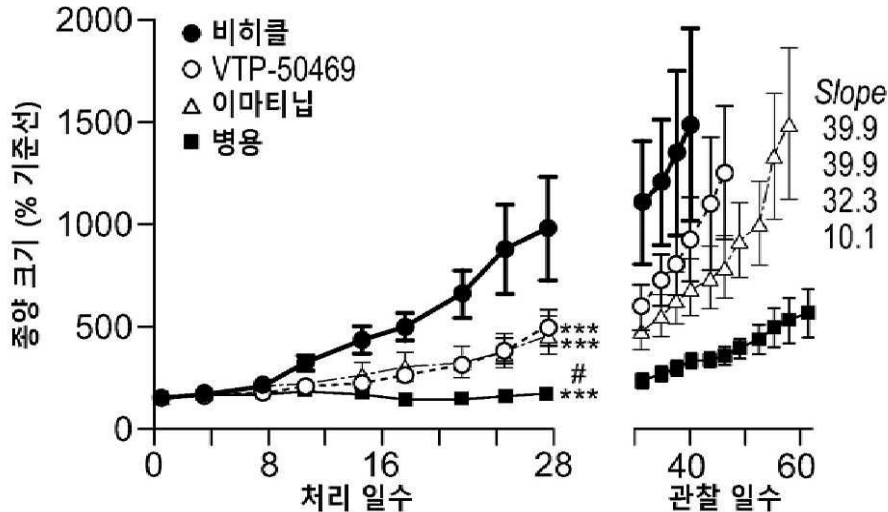
전체 청구항 수 : 총 38 항

(54) 발명의 명칭 메닌-MLL 후성유전학적 복합체 파괴에 의한 위장관 기질 종양(GIST)의 치료 표적화

(57) 요약

메닌-MLL 복합체를 억제하는 활성제와 함께, 대상체의 위장관 기질 종양(GIST)의 치료 방법 및 억제제가 개시된다.

대표도 - 도7a



(52) CPC특허분류

A61K 31/445 (2013.01)

A61K 31/4545 (2013.01)

A61K 31/519 (2013.01)

A61K 31/53 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A61K 2300/00 (2023.05)

명세서

청구범위

청구항 1

대상체에서 위장관 기질 종양 (gastrointestinal stromal tumor: GIST)을 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 대상체에게 치료적 유효량의 메닌(Menin) 억제제를 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 메닌 억제제는 JNJ-75276617, KO-539, SNDX-5613, DS-1594, DSP-5336, MI-3454, M-808, BMF-219, A300-105A, VTP-50469, 짧은 간섭 RNA (short interfering RNA: siRNA), 또는 이들 중 둘 이상의 조합인 것인, 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 메닌 억제제는 SNDX-5613인 것인, 방법.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 메닌 억제제는 VTP-50469인 것인, 방법.

청구항 5

제2항에 있어서, 상기 메닌 억제제는 M-808인 것인, 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 메닌 억제제는 경구, 근육내, 피하, 또는 정맥으로 투여되는 것인, 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체에게 치료적 유효량의 티로신 키나아제 억제제 (TKI)를 투여하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 TKI는 이마티닙(imatinib), 수니티닙, 레고라페닙, 리프레티닙(ripretinib), 닐로티닙, 파조파닙, 카보잔티닙, 아바프리티닙(avapritinib), 또는 이들 중 둘 이상의 조합인 것인, 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 TKI는 이마티닙인 것인, 방법.

청구항 10

제7항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 TKI는 메닌 억제제의 투여 이후에 투여되는 것인, 방법.

청구항 11

제7항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 TKI는 메닌 억제제의 투여와 실질적으로 동시에 투여되는 것인, 방법.

청구항 12

제7항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 TKI는 메닌 억제제의 투여 전에 투여되는 것인, 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 치료적 유효량의 MOZ 억제제를 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 MOZ 억제제는 WM-1119, WM-8014, PF-9363, siRNA, 또는 이들 중 둘 이상의 조합인 것인, 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 MOZ 억제제는 WM-1119인 것인, 방법.

청구항 16

제13항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 MOZ 억제제는 경구, 근육내, 피하, 또는 정맥으로 투여되는 것인, 방법.

청구항 17

제13항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 MOZ 억제제는 메닌 억제제의 투여 이후에 투여되는 것인, 방법.

청구항 18

제13항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 MOZ 억제제는 메닌 억제제의 투여와 동시에 투여되는 것인, 방법.

청구항 19

제13항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 MOZ 억제제는 메닌 억제제의 투여 전에 투여되는 것인, 방법.

청구항 20

제17항에 있어서, 상기 MOZ 억제제는 TKI의 투여 이후에 투여되는 것인, 방법.

청구항 21

제18항에 있어서, 상기 MOZ 억제제는 TKI의 투여와 실질적으로 동시에 투여되는 것인, 방법.

청구항 22

제19항에 있어서, 상기 MOZ 억제제는 TKI의 투여 전에 투여되는 것인, 방법.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 수용체 티로신 키나아제 (KIT) 유전자 내 또는 주변에 활성화 돌연변이(activating mutation)가 있는 것으로 진단된 것인, 방법.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 GIST는 전이성인 것인, 방법.

청구항 25

시험관 내(*in vitro*) 또는 생체 내(*in vivo*)에서 KIT 활성을 감소시키는 방법으로, 상기 방법은 KIT 유전자 내 또는 주변의 활성화 돌연변이를 갖는 세포를 메닌 억제제와 접촉시키는 것을 포함하는, 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 메닌 억제제는 MI-3454, M-808, JNJ-75276617, KO-539, SNDX-5613, DS-1594, DSP-5336, BMF-219, A300-105A, VTP-50469, 또는 이들 중 둘 이상의 조합인 것인, 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 메닌 억제제는 SNDX-5613인 것인, 방법.

청구항 28

제26항에 있어서, 상기 메닌 억제제는 VTP-5613인 것인, 방법.

청구항 29

제25항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포를 TKI와 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 TKI는 이마티닙, 수니티닙, 레고라페닙, 리프레티닙, 닐로티닙, 파조파닙, 카보잔티닙, 아바프리티닙, 또는 이들 중 둘 이상의 조합인 것인, 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 TKI는 이마티닙인 것인, 방법.

청구항 32

제25항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포를 치료적 유효량의 MOZ 억제제와 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, 상기 MOZ 억제제는 WM-1119인 것인, 방법.

청구항 34

치료적 유효량의 메닌 억제제, 적합한 용기에 배치된 약제학적으로 허용가능한 담체, 및 대상체의 GIST 치료에 메닌 억제제를 사용하기 위한 인쇄된 지침(instruction)을 포함하는, 키트.

청구항 35

제34항에 있어서, 상기 메닌 억제제는 SNDX-5613인 것인, 키트.

청구항 36

제34항 또는 제35항에 있어서, 상기 키트는 치료적 유효량의 TKI, 및 대상체의 GIST 치료에 TKI를 사용하기 위한 인쇄된 지침을 추가로 포함하고,

이때 상기 메닌 억제제 및 TKI는 동일 또는 상이한 용기에 배치되는, 동일한 제형 또는 상이한 제형에 함유된 것인, 키트.

청구항 37

제36항에 있어서, 상기 TKI는 이마티닙인 것인, 키트.

청구항 38

제34항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 키트는 치료적 유효량의 MOZ 억제제, 및 대상체의 GIST 치료

에 MOZ 억제제를 사용하기 위한 인쇄된 지침을 추가로 포함하고,

이때 상기 메닌 억제제 및 MOZ 억제제는 동일 또는 상이한 용기에 배치되는, 동일한 제형 또는 상이한 제형에 함유된 것인, 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 2021년 12월 15일에 출원된 미국 가출원 번호 제63/289,943에 대한 35 U.S.C. § 119(e) 하의 우선권의 이익을 주장하며, 이의 전체 내용이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 정부 라이선스 권리

[0004] 본 발명은 국립 보건원(National Institutes of Health)이 수여한 허여 번호 K08 CA245235 및 UL 1TR002541에 따른 정부 지원으로 만들어졌다. 정부는 본 발명에 대한 일정 권리를 갖는다.

[0005] 서열 목록

[0006] 본 출원에는 XML 형식의 전자 문서로 전자적으로 제출되고, 전체 내용이 참조로 포함된 서열목록이 포함되어 있다. 2022년 12월 14일에 생성된 해당 XML 복사본의 파일명은 52095-752001WO_SL.xml이고 크기는 51KB 바이트이다.

배경 기술

[0007] 위장관 기질 종양 (Gastrointestinal stromal tumor: GIST)은 소화계의 어느 부분이나 발생할 수 있는 연부조직육종(soft tissue sarcoma)으로, 가장 일반적으로 위와 소장에서 발생한다. GIST는 티로신 키나아제 KIT 전암유전자(proto-oncogene), 수용체 티로신 키나아제(KIT) 또는 혈소판 유래 성장 인자 수용체 알파(PDGFR α) 내 또는 주변의 재발성 활성화 돌연변이를 특징으로 한다 (문헌 [Corless *et al.*, Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. 3:557-86 (2008)], [Hemming *et al.*, Annals of Oncology. 3:557-9 (2018)] 참조).

[0008] KIT 및/또는 PDGFR α 내 또는 주변의 돌연변이는 GIST 사례의 85% 이상을 차지한다. KIT 1차 돌연변이의 대부분은 티로신 키나아제 억제제(TKI) 이마티닙을 사용한 치료에 반응한다. 그러나, 시간이 지남에 따라 2차 키나아제 돌연변이가 발생하여 이마티닙-내성 GIST가 생성된다. 수니티닙, 레고라페닙 및 리프레티닙은 이후 치료 라인에서 이마티닙-내성 GIST 치료용으로 승인되었지만, 이들 약물에 대한 내성도 시간이 지남에 따라 발생한다 (문헌 [Demetri *et al.*, N. Engl. J. Med. 347(7):472-80 (2002)], [Blay *et al.*, Lancet Oncol. 21(7):923-34 (2020)], [Voss and Hager, Nat. Rev. Genet. 15(2):69-81 (2014)], [Chen and Dent, Nat. Rev. Genet. 15(2):93-106 (2014)] 참조).

[0009] 따라서, 다제내성 GIST에 대한 치료법이 시급히 필요하다.

발명의 내용

[0010] 본 개시의 제1 측면은 위장관 기질 종양(GIST)을 치료하는 방법에 관한 것이다. 이 방법은 대상체에게 치료적 유효량의 메닌 억제제를 투여하는 것을 수반한다. 일부 구현예에서, 방법은 또한 대상체에게 치료적 유효량의 티로신 키나아제 억제제(TKI) 및/또는 치료적 유효량의 MOZ 억제제를 투여하는 것을 수반한다.

[0011] 본 개시의 또 다른 측면은 시험관 내(*in vitro*) 또는 생체 내(*in vivo*)에서 KIT 활성을 감소시키는 방법이다. 이 방법은 KIT 유전자 내 또는 주변에 활성화 돌연변이를 갖는 세포를 메닌 억제제와 접촉시키는 것을 수반한다. 일부 구현예에서, 방법은 대상체에게 치료적 유효량의 TKI 및/또는 치료적 유효량의 MOZ 억제제를 투여하는 것을 수반한다.

[0012] 본 개시의 또 다른 측면은 치료적 유효량의 메닌 억제제, 적합한 용기(container)에 배치된 약제학적으로 허용되는 담체, 및 대상체의 GIST 치료에 메닌 억제제를 사용하기 위한 인쇄된 지침(instruction)을 함유하는 키트에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 키트는 또한 치료적 유효량의 TKI 및 대상체의 GIST 치료에 TKI를 사용하기 위한 인쇄된 지침을 함유하며, 여기서 메닌 억제제 및 TKI는 동일하거나 상이한 용기에 배치된, 동일한 제형 또

는 상이한 제형으로 함유된다. 일부 구현예에서, 키트는 또한 치료적 유효량의 MOZ 억제제 및 대상체의 GIST 치료에서 MOZ 억제제를 사용하기 위한 인쇄된 지침을 함유하며, 여기서 메닌 억제제 및 MOZ 억제제는 동일하거나 상이한 용기에 배치되는, 동일한 제형 또는 상이한 제형으로 함유된다.

[0013] 실시예에 나타난 바와 같이, 본 발명자들은 메닌-MLL 및 MOZ 염색질 조절 복합체가 GIST-연관 유전자에 풍부하고, 이들의 전사 및 GIST 후생유전체의 전사를 조절한다는 것을 보여주었다. 메닌-MLL 복합체의 억제제는 단독으로 또는 MOZ 복합체 억제와 함께, DOT1L과 같은 전사 및 염색질 조절자와의 상호 작용을 방해하여 GIST 세포 증식을 감소시켰다. 메닌 및 MOZ 억제는 생체 내에서 종양 부담(tumor burden)을 크게 감소시켰으며, 메닌 및 KIT 억제를 결합하면 훨씬 더 큰 효과가 관찰되었다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1a 내지 1g는 게놈-규모 CRISPR 의존성 스크린을 통해 GIST 후생유전학적 의존성의 식별(identification)을 보여주는 일련의 산점도, 막대 및 점 플롯이다. 도 1a 및 1b는 상관관계 β-점수를 나타내는 산점도이다. 도 1a는 각각 라이브러리당 5개의 sgRNA로 18,436개의 유전자를 표적으로 하는, H1 및 H2 sgRNA 라이브러리 간의 상관관계를 보여준다. 도 1b는 GIST430 및 GIST-T1 세포주 간의 상관관계를 보여준다. 도 1c는 H1 및 H2 라이브러리 및 GIST 세포주를 병합한 β-점수 및 스크린에서의 순위를 보여주는 산점도이다. 도 1d 및 1e는 기준 플라스미드 라이브러리 시퀀싱과 스크리닝 최종 결과를 비교한 개별 sgRNA에 대한 상대적 리드(read) 보여주는 막대 그래프이다. 도 1d는 KIT sgRNA를 보여주는 막대 그래프이고, 도 1e는 MTOR sgRNA를 보여주는 막대 그래프이다. 도 1f는 범-필수(pan-essential) 유전자와 비-필수(non-essential) 유전자의 β-점수를 비교하는 점 플롯이다. 도 1g는 GIST에 고유하게 필수적인 유전자 중 유의미하게 풍부한 상위 18개 유전자 온톨로지 용어(ontology term) 중 8개를 보여주는 막대 그래프이다.

도 2a 내지 2f는 일련의 산점도, 서코스(Circos), 선 및 막대 그래프로, MOZ와 메닌-MLL 복합체의 독특한 공동-의존성을 보여준다. 도 2a는 염색질 변형 효소에 대한 GIST-T1 및 GIST430의 병합된 β-점수와 DepMap의 모든 세포주의 평균 CERES 점수의 산점도이다. 도 2b는 GIST에서 농축된(enriched) 의존성을 갖는 7개 염색질 변형 효소의 상위 50개 DepMap 상관 의존성의 중첩을 보여주는 서코스 플롯이다. 도 2c 및 2d는 메닌-MLL 복합체 구성원 KMT2A 및 ASH2L에 대한 프로젝트 드라이브(Project Drive) 세포주의 순위 민감도 점수를 보여주는 산점도이며, GIST-T1은 빨간색으로 강조 표시되었다. 도 2e는 선 플롯으로서, GIST-T1에서 메닌-MLL 복합체 구성원을 표적으로 하는 지정된 sgRNA의 형질도입 후 시간 경과에 따른 성장 분석을 보여준다. 도 2f는 막대 플롯으로서, GIST-T1과 GIST48B를 비교한 시간 경과에 따른 성장 분석에서 21일차 세포 수를 보여준다.

도 3a 내지 3i는 GIST에서 MOZ 및 메닌-MLL 복합체의 게놈 위치를 보여주는 일련의 히트 맵, 벤 다이어그램, 산점도 및 트랙(track)이다. 도 3a는 ChIP-seq에 의한 H3K27ac, H3K9ac, H3K4me3, BRPF1 및 KAT6A의 GIST-T1, 및 CUT&Tag에 의한 메닌 및 MLL1n의 게놈 위치를 보여주는 일련의 히트 맵이다. 도 3b 내지 3d는 MACS-정의된 피크의 중첩을 보여주는 다이어그램이다. 도 3b는 BRPF1 및 KAT6A를 도시한 다이어그램이다. 도 3c는 메닌 및 BRPF1을 도시한 다이어그램이다. 도 3d는 메닌 및 MLL1n을 도시한 벤 다이어그램이다. 도 3e는 BRPF1 결합의 농축된 게놈 영역을 보여주는 산점도이며, TF는 빨간색으로 표시된다. 도 3f는 메닌 결합의 농축된 게놈 영역을 보여주는 산점도이며, TF는 빨간색으로 표시된다. 도 3g 내지 3i는 다양한 유전자좌에서 TF HAND1, MOZ 복합체 구성원 BRPF1 및 KAT6A, 메닌-MLL 복합체 구성원 메닌 및 MLL1n, 히스톤 마커 H3K4me3, H3K9ac 및 H3K27ac의 게놈 점유 영역을 보여주는 트랙(track)이다; FOXF1 좌위를 보여주는 도 3g, DUSP6 좌위를 보여주는 도 3h, 및 USP1 좌위를 보여주는 도 3i.

도 4a 내지 4f는 일련의 선 및 막대 플롯으로, MOZ 복합체 억제 유무에 관계없이 메닌-MLL 복합체의 억제가 세포주기 정지로 이어진다는 것을 보여준다. 도 4a는 표시된 농도의 메닌 억제제 VTP-50469를 사용한 GIST-T1에서의 시간 경과에 따른 성장 분석을 보여주는 선 플롯이다. 도 4b는 WM-1119의 존재 또는 부재 하에 VTP-50469로 처리된 GIST-T1에서 시간 경과에 따른 성장 분석을 보여주는 선 플롯이며, 각 억제제는 0.1 μM로 사용된다. 도 4c는 WM-1119의 존재 또는 부재 하에 VTP-50469를 사용하여 GIST48B, GIST-T1 또는 KIT 인핸서 독립적 세포주 GIST-T1/KIT^Δe11 (CMV 프로모터 구동 돌연변이체 KIT의 구제(rescue)로 녹아웃된 내인성 KIT)을 처리한 후, DMSO로 정규화된 21일차 세포 수를 보여주는 막대 플롯이다. 도 4d는 GIST430의 시간 경과에 따른 성장 분석을 보여주는 막대 플롯이며, VTP-50469의 존재 또는 부재 하에 0.5 μM의 VTP-50469로 처리한 후 42일차의 상대 세포 수가 표시된다; 이 조합은 0.1 μM의 각 약물과 함께 사용되었다. 도 4e는 G0/G1, S 또는 G2/M의 세포의 백분율에 관한 세포 주기 분석을 보여주는 막대 플롯으로, VTP-50469의 존재 또는 부재하에, DMSO와 72시간 이마티닙 또는 8일간 0.5 μM의 VTP-50469를 비교한 것이다; 병용의 경우 각 약물을 0.1 μM으로 사용했다. 도 4f는

초기 세포자연사(apoptosis) 또는 후기 세포자연사에서, 이마티닙을 0.5 μ M으로 72시간 처리하거나, VTP-50469를 0.5 μ M으로 8일간 처리하거나, 또는 WM-1119와 함께 VTP-50469를 각각 0.1 μ M로 처리한 후의 세포 사멸을 DMSO 대조군과 비교한 배수 변화를 보여주는 막대 플롯이다.

도 5a 내지 5w는 MOZ 억제 유무에 따른 메닌 억제의 전사 효과를 보여주는 일련의 산점도 및 막대 플롯이다. 도 5a는 GIST-T1 세포에서 억제제 처리 5일 후 모든 발현된 유전자에 대한 억제제 및 DMSO 처리 간의 발현의 비율을 나타내는 산점도이다. 도 5b는 5일째 VTP-50469 (파란색)를 DMSO 대조군과 비교한 NES 및 FDR q-값을 나타내는 모든 홀마크(hallmark) 유전자 세트의 나비형 플롯이다. 도 5c는 DMSO와 VTP-50469를 비교하는 홀마크 MTORC1 신호전달 및 EMT 유전자 세트를 보여주는 산점도이다. 도 5d는 모든 발현된 유전자, 필수 유전자, 6시간 이마티닙 처리로 2.5배 초과로 하향조절된 유전자 및 VTP-50469로 5일 동안 처리한 GIST-T1 세포에서 설정된 홀마크 EMT 유전자에 대한, DMSO 대조군으로 정규화된, 상대적 발현을 보여주는 막대 그래프이다. 도 5e는 메닌 결합이 농축된 유전자와 농축(enrichment)이 부족한 유전자를 비교하여 모든 발현된 유전자의 상대적 발현을 DMSO 대조군으로 정규화한 막대 그래프이다. 도 5f는 메닌에 의해 결합된 핵심(core) GIST TF의 상대적 발현을 보여주는 막대 그래프이다. 도 5g 및 5h는 0.5 μ M의 VTP-50469를 5일 동안 또는 WM-1119와 함께 VTP-50469를 각각 0.1 μ M로 처리한 세포에서 KIT 신호전달 DUSP6, SE-연관 NPR3 및 필수 유전자 USP1의 음성 조절인자의 qRT-PCR에 의한 상대적인 mRNA 수준을 보여주는 막대 그래프이다. 도 5i는 GIST-T1과 VTP-50469 처리를 비교하는 RNA-seq 데이터의 비감독형 (unsupervised) 계층적 클러스터링(clustering)을 보여주는 히트 맵이다. 도 5j는 sgRNA로 형질도입된 GIST-T1/Cas9 세포를 비교하는 RNA-seq 데이터의 비감독형 계층적 클러스터링을 보여주는 히트 맵이다. 도 5k는 대조군-정규화된 RNA-seq 데이터의 피어슨 상관관계를 보여주는 히트 맵이다. 도 5l 내지 5n은 대조군-정규화된 sgRNA 또는 병용 약물 처리를 비교한 상위 5,000개의 발현 전사체에서의 유전자 발현 변화의 상관관계 플롯이다. 도 5o는 GSEA 유전자 세트로부터의 정규화된 농축 점수(normalized enrichment scores: NES)를 보여주는 히트 맵이다. 도 5p 내지 5s는 메닌/BRPF1-농축된 유전자, SE 연관 유전자 및 HAND1-조절 유전자의 변화를 보여주는 GSEA 플롯이다. 도 5t는 HAND1에 의해 상향조절되는 유전자의 대조군-정규화된 발현을 나타내는 박스 플롯이다. 도 5u 내지 5w는 약물 및 sgRNA 치료 조건 전반에 걸쳐 GIST 계통, TF 또는 HAND1 조절과 연관된 선택된(select) 유전자의 발현을 나타내는 도트 플롯이다.

도 6a 내지 6q는 메닌 억제 후 단백질 상호작용의 변화를 보여주는 일련의 사진 이미지, 분산, 막대, 히트맵, 도트 플롯 및 트랙이다. 도 6a는 모 GIST-T1 세포 또는 sgRNA 결실 및 BirA*(R118G)에 융합된 코돈 최적화된 MEAF6 단백질로 구제(rescue) 후 세포의 웨스턴 블롯이다. 도 6b는 MEAF6 BioID에 의해 식별된 근위 단백질의 PSM 및 \log_2 신호 강도의 산점도이다. 도 6c는 MEAF6 근위 단백질에 대한 GO 용어 농축을 보여주는 막대 플롯이다. 도 6d는 비오틴 표지화 동안 억제제로 2일 전처리 및 추가 24시간 처리 후 MEAF6-농축 단백질에 대한 VTP-50469/DMSO 신호 강도의 \log_2 비율의 산점도이다. 도 6e는 VTP-50469, 또는 VTP-50469와 WM-1119의 병용 치료에 반응하여 적어도 하나의 조건에서 유의미하게 변화하는 67개 유전자의 DMSO-정규화된 신호 강도의 비감독형 계층적 클러스터링을 보여주는 히트맵이다. 도 6f 내지 6g는 VTP-50469 또는 WM-1119와 병용된 VTP-50469의 농축된 단백질 상호작용자에 대한 DMSO-정규화된 신호 강도의 도트 플롯이다. 도 6h는 DMSO 또는 VTP-50469로 처리된 GIST-T1 세포의 MACS-정의된 피크에서 DOT1L의 스파이크-인 정규화된 신호를 보여주는 히트맵 세트이다. 도 6i 및 6j는 MACS-정의된 피크에서 스파이크-인 정규화된 DOT1L (도 6i) 또는 MEAF6 (도 6j) 신호를 보여주는 박스 플롯이다. 도 6k는 HAND1 유전자좌에서, 표시된(indicated) 처리 하에서 스파이크-인 정규화된 DOT1L, H3K79me2, MEAF6 및 H3K27ac의 게놈 점유 영역을 보여주는 트랙의 플롯이다. 도 6l은 표시된 농도의 EPZ-5676을 사용하여 GIST-T1 또는 GIST48B를 처리한 후 DMSO로 정규화된 21일차 세포 수를 보여준다. 도 6m은 표시된 억제제로 5일 동안 처리된 세포로부터의 대조군-정규화된 RNA-seq 데이터의 피어슨 상관관계를 보여주는 히트 맵이다. 도 6n은 대조군-정규화된 약물 처리를 EPZ-5676 및 VTP-50469와 비교하여, 발현된 전사체(n=5,000)에서의 유전자 발현 변화의 피어슨 상관관계이다. 도 6o는 EPZ-5676 처리로 인해 발생하는 HAND1-조절 유전자의 변화를 보여주는 GSEA 플롯이다. 도 6p 및 6q는 GIST 계통 및 TF (조건당 n=4)와 연관된 선택 유전자의 발현을 나타내는 도트 플롯이다.

도 7a 내지 7f는 생체 내에서 GIST에 대한 메닌 억제의 효과를 설명하는 선 플롯 및 일련의 현미경 사진이다. 도 7a는 이마티닙, VTP-50469, 이마티닙과 VTP-50469의 병용, 또는 비히클 대조군으로 28일 동안 처리된 GIST-T1 세포주 이중이식을 나타내는 선 플롯이다. 도 7b는 이마티닙, VTP-50469, 이마티닙과 VTP-50469의 병용, 또는 비히클 대조군으로 18일 동안 처리된 PG27 PDX를 나타내는 선 플롯이다. 도 7c는 처리 기간 말기에 수확하고, 고정하고, 절개하고, H&E로 염색한 PG27 종양의 조직 절편을 보여주는 일련의 현미경 사진이다. 도 7d는 28일 동안 처리된 GIST-T1 세포주 이중이식을 나타내는 선 플롯이다. 도 7e는 5일 또는 10일 동안 처리된

GIST-T1 세포주 이중이식에 대해 수행된 RNA-seq의 데이터를 보여주는 히트 맵이다. 도 7f는 GIST 계통, 이마티닙 조절 또는 세포 증식과 연관된 선택 유전자의 FPKM에서의 발현을 나타내는 도트 플롯이다.

도 8a 내지 8n은 일련의 막대, 선 및 산점도로 고유한 GIST 의존성을 보여준다. 도 8a는 GIST에 고유하게 필수적인 유전자 중 상위 18개의 유의미하게 농축된 유전자 온톨로지 용어(ontology term)를 보여주는 막대 플롯이다. 도 8b는 메닌-MLL 복합체 구성원을 강조한 스크린 내 순위 및 β -점수의 선 플롯이다. 도 8c는 INO80 복합체 구성원을 강조한 스크린 내 순위 및 β -점수의 선 플롯이다. 도 8d는 NuA4 히스톤 아세틸트랜스퍼라제 복합체 구성원을 강조한 스크린 내 순위 및 β -점수의 선 플롯이다. 도 8e 내지 8g는 INO80 및 NuA4 복합체의 선택된 구성원에 대한 프로젝트 드라이브 세포주로부터의 순위 민감도 점수(Ranked Sensitivity Score)의 산점도이다. 도 8h는 FACT 복합체 구성원을 강조한 스크린 내 순위 및 β -점수의 선 플롯이다. 도 8i 내지 8j는 FACT 복합체의 구성원에 대한 프로젝트 드라이브 세포주로부터의 순위 민감도 점수의 산점도이다. 도 8k는 PAF1 복합체 구성원을 강조한 스크린 내 순위 및 β 점수의 선 플롯이다. 도 8l 내지 8m은 PAF1 복합체의 선택된 구성원에 대한 프로젝트 드라이브 세포주에서 얻은 순위 민감도 점수의 산점도이다. 도 8n은 기준선 플라스미드 라이브러리 (sgRNA당 n=2)로 정규화된, GIST-T1 또는 GIST430에서 표시된 유전자를 표적으로 하는 상위 8개 sgRNA에 대한 상대적 리드(read)를 보여주는 막대 플롯이다.

도 9a 내지 9e는 GIST에서의 PRC2 복합체 의존성을 나타내는 일련의 선 플롯 및 산점도이다. 도 9a는 핵심 PRC2 복합체 구성원을 강조한 스크린 내 순위와 β -점수를 보여주는 선 플롯이다. 도 9b 내지 9c는 PRC2 복합체의 선택된 구성원에 대한 프로젝트 드라이브 세포주에서 얻은 순위 민감도 점수이다. 도 9d는 DepMap 세포주 (n=726)에 걸쳐 EZH2 복합체 구성원에 대한 순위 및 CERES 종속성 점수의 플롯이며, -1에서의 점선은 유의미한 종속성을 나타낸다. 도 9e는 DepMap에서 EZH2의 상위 유전자 의존성 상관관계를 보여준다. 상호-의존적 염색질 변형 효소 및 복합체 구성원이 표시되어 있다.

도 10a 내지 10h는 GIST 내에서 메닌-MLL 복합체 국소화(localization)를 보여주는 일련의 다이어그램 및 트랙이다. 도 10a는 선택된 GIST-연관 유전자가 표시된 메닌과 BRPF1 사이의 농축된 영역에서 중복을 보여주는 다이어그램이다. 도 10b 내지 10h는 TF HAND1, 메닌-MLL 복합체 구성원 메닌 및 MLL1n, 및 히스톤 마크 H3K4me3, H3K9ac 및 H3K27ac의 게놈 점유 영역을 보여주는 트랙이다; 도 10b는 OSR1 유전자좌를 보여주고, 도 10c는 PDGFRA 유전자좌를 보여주고; 도 10d는 KIT 유전자좌를 보여주고, 도 10e는 KDR 유전자좌를 보여주고, 도 10f는 MEIS1 유전자좌를 보여주고, 도 10g는 HAND1 유전자좌를 보여주고, 및 도 10h는 NPR3 유전자좌를 보여준다.

도 11은 WM-1119와 병용된 VTP-50469 또는 VTP-50469로 억제된 천천히 성장하는 GIST 세포주 GIST430 및 GIST882의 첫 번째 세대 후 DMSO-정규화된 세포 수를 보여주는 막대 플롯이다.

도 12a 내지 12c는 메닌 억제의 전사 효과를 설명하는 일련의 산점도 및 막대 플롯이다. 도 12a는 억제제 치료 5일 후 상위 500개 필수 유전자에 대한 억제제 및 DMSO 처리 사이의 발현 비율을 나타내는 산점도이다. 도 12b는 VTP-50469로 1일 또는 5일 처리 시 KIT 신호 전달 SPRY2, SPRY4 및 DUSP6의 음성 조절인자의 상대적 발현을 보여주는 막대 플롯이다. 도 12c는 VTP-50469로 1일 또는 5일 처리 시 KIT의 상대적 발현을 보여주는 막대 플롯이다.

도 13a 내지 13j는 DOT1L, H3K79me2 및 MEAF6의 ChIP-seq 결과 및 VTP-50469의 효과를 보여주는 일련의 히트 맵, 산점도 및 트랙이다. 도 13a는 DMSO 또는 VTP-50469로 처리된 GIST-T1 세포의 MACS-정의된 피크에서 MEAF6의 스파이크-인 정규화된 신호를 보여주는 히트맵이다. 도 13b 내지 13c는 DOT1L의 농축된 게놈 영역 및 H3K79me2 결합을 나타내는 산점도이다. 도 13d는 ChIP-seq를 통해 DOT1L, H3K79me2 및 MEAF6의 GIST-T1에서 게놈 국소화를 보여주는 일련의 히트 맵이다. 도 13e는 GPR20 유전자좌에서 표시된 처리, H3K79me2 및 H3K27ac 하에서, 스파이크-인 정규화된 DOT1L의 게놈 점유 영역을 보여주는 트랙 세트이다. 도 13f는 메닌-MLL, MOZ 및 PRC2 복합체의 구성원이 표시된 DepMap에서 DOT1L의 상위 70개 유전자 의존성 상관관계를 보여주는 도트 플롯이다. 도 13g는 DOT1L에 대한 농축된 (n=1,343) 또는 일반적인 (n=45,256) 신호가 있는 영역에서 DOT1L에 대한 DMSO-정규화된 신호를 보여주는 박스 플롯이다. 도 13h는 표시된 억제제를 사용한 5일 처리 후 DOT1L 신호를 나타내는 웨스턴 블롯의 사진이다. 도 13i는 표시된 약물로 처리한 지 5일 후 RNA-seq에 의한 DOT1L 발현 수준을 보여주는 도트 플롯이다. 도 13j는 2개의 DOT1L 엑손 또는 대조군으로서 Luc 또는 RPS19를 표적화하는 sgRNA를 비교하는 시간 경과에 따른 성장 분석에서 21일차의 GIST-T1 세포 수를 보여주는 막대 플롯이다.

도 14a 내지 14f는 생체 내에서 메닌 억제 효과를 보여주는 선 플롯 및 일련의 현미경 사진이다. 도 14a는 GIST-T1 세포주를 이식하고, 이마티닙, VTP-50469, 이마티닙과 VTP-50469의 병용 및 비히클 대조군을 28일 동안

처리한 마우스의 체중을 보여주는 선 플롯이다. 도 14b는 PG27 PDX가 이식되고, 이마티닙, VTP-50469, 이마티닙과 VTP-50469의 병용 및 비히클 대조군으로 18일 동안 처리된 마우스의 체중을 나타내는 선 플롯이다. 도 14c는 PG27 종양의 조직 절편을 치료 기간 말기에 수확하고 고정된 조직을 절개하여 Ki-67 (상단 행) 및 절단된 카스파제-3 (하단 행)에 대해 평가한 일련의 현미경 사진이다; 스케일 바(scale bar) = 25 μm. 도 14d는 마우스에 GIST-T1 세포주를 이식하고 sgRNA를 처리한 후의 종양 크기를 나타내는 선 플롯이다. 도 14e는 GIST-T1 세포주를 이식하고, VTP-50469, WM-1119, VTP-50469와 WM-1119의 병용, 또는 비히클 대조군을 28일 동안 처리한 마우스의 체중을 보여주는 선 플롯이다. 도 14f는 각 처리군에서 모든 발현된 유전자(n=7,434) 또는 그 발현이 HAND1에 의해 상향 조절되는 유전자(n=438)의 대조군-정규화된 발현을 보여주는 박스 플롯이다.

도 15a 내지 15c는 GIST 세포주에서 KAT6A, 메닌 및 BRPF1 억제제를 보여주는 일련의 선 및 막대 플롯이다. 도 15a는 GIST-T1 또는 GIST48B를 50nM 이마티닙으로 처리한 후, 시간 경과에 따른 성장 분석을 보여주는 선 플롯이다. 도 15b는 천천히 성장하는 GIST 세포주 GIST430 (6일), GIST882 (12일) 및 GIST48 (12일)의 첫 번째 세대 후 DMSO-정규화된 세포 수를 GIST-T1(4일)과 비교하여 보여주는 막대 플롯이다. 도 15c는 GIST-T1 또는 GIST48B 세포를 선택적 BRPF1 억제제 GSK6853 또는 PFI-4로 처리한 시간 경과에 따른 성장 분석을 보여주는 선 플롯이다.

도 16a 내지 16h는 MOZ 및 메닌 파괴의 전사 효과를 보여주는 막대 플롯, 박스 플롯 및 히트맵 세트이다. 도 16a는 약물 또는 sgRNA 처리에 반응하여 10개의 GIST-연관 TF의 발현을 대조군에 대해 정규화한 히트 맵이다. 도 16b는 표시된 약물 처리에서 (조건당 n=4) 18개 GIST-연관 TF의 DMSO-정규화된 발현을 보여주는 박스 플롯이다. 도 16c 내지 16f는 GIST 세포주에서 KIT 신호전달 DUSP6 및 HAND1- 및 SE-연관 유전자 NPR3의 음성 조절 인자의 상대적인 mRNA 수준을 나타내는 막대 플롯 세트이다. 도 16g는 각 약물 또는 sgRNA 처리 조건에서 리액툼(Reactome) 번역-연관 유전자 세트의 NES를 나타내는 GSEA 데이터를 보여주는 히트 맵이다. 도 16h는 각각의 sgRNA 및 약물 처리 조건에서 모든 번역-연관 유전자 (n=48)의 대조군-정규화된 발현을 보여주는 박스 플롯이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 정의

[0016] 구체적으로 언급되거나 문맥상 명백하지 않는 한, 본원에 사용된 용어 "약"은, 예를 들어, 평균의 2개의 표준편차 내에서 당업계의 정상 허용오차 내에 있는 것으로 이해된다. "약"은 명시된 값의 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.1%, 0.05%, 또는 0.01% 이내인 것으로 이해될 수 있다. 문맥상 달리 명백하지 않는 한, 본원에 제공된 모든 수치 값들은 "약"이라는 용어로 수식된다.

[0017] "작용제(agent)"는 임의의 작은 화합물(small compound), 항체, 핵산 분자, 폴리펩티드 또는 이들의 단편을 의미한다. 구체적으로 언급되거나 문맥상 명백하지 않은 한, 본원에서 사용된 용어 "또는"은 포괄적인 것으로 이해된다. 구체적으로 언급되거나 문맥상 명백하지 않은 한, 본원에서 사용된 용어 "a", "an", 및 "the"는 단수 또는 복수로 이해된다.

[0018] 본원에 제공된 임의의 조성물 또는 방법은 본원에 제공된 임의의 다른 조성물 및 방법 중 하나 이상과 조합될 수 있다.

[0019] "포함하는(including)", "함유하는(containing)", 또는 "~을 특징으로 하는(characterized by)"과 동의어인 접속 용어(transitional term) "포함하는(comprising)"은 포괄적이거나 개방적이며, 추가의 언급되지 않은 요소들 또는 방법 단계들을 배제하지 않는다. "이루어진(consisting of)"이라는 접속 어구는 청구범위에 명시되지 않은 임의의 요소, 단계, 또는 성분을 배제한다. "필수적으로 이루어진(consisting essentially of)"이라는 접속 어구는 청구범위의 범위를, 청구된 개시의 "기본적이고 신규한 특성(들)에 실질적으로 영향을 미치지 않는" 특정 재료들 및 단계들로 제한한다.

[0020] 본 개시의 다른 특징 및 이점은 다음의 바람직한 구현예에 대한 설명 및 청구범위로부터 명백해질 것이다. 달리 정의하지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술 및 과학 용어들은 본 개시가 속하는 기술분야의 통상의 기술자에게 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 본원에서 기술된 것과 유사하거나 등가의 방법 및 재료가 본 개시의 실행 또는 시험에서 이용될 수 있으나, 적합한 방법 및 재료가 하기에 기술된다.

[0021] 사용 방법

[0022] 일부 측면에서, 본 개시는 대상체에서 GIST를 치료하는 것에 관한 것이다. 이 방법은 메닌 억제제의 유효량 또

는 치료적 유효량을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 수반한다.

[0023] GIST는 종종 티로신 키나아제 *KIT* 유전자 및/또는 *PDGFRA* 유전자 내 또는 주변의 재발성(recurrent) 활성화 돌연변이를 특징으로 하는 연부조직육종이다. 본원에서 사용된 어구 "내 또는 주변(in or around)"은 유전자의 암호화 영역 내의 돌연변이 또는 유전자 기능에 기여하는 유전자의 5' 또는 3' 근위 영역 (예를 들어, 유전자 전사에 영향을 미치는 조절 영역)의 돌연변이를 의미한다. GIST는 중앙 유전자 증폭이 부족하고, 확립된 전사 인자 네트워크에 의존한다. 고유한 염색질 변형 효소는 GIST 후성유전체를 조직하는 데 필수적인 것으로 실시예에 보여지고 있다; 예를 들어, *KMT2A/MLL1*은 이전에 알려지지 않은 GIST의 의존성(dependency)으로 본원에서 확립되었으며, 보다 광범위하게는 특정 암 서브타입(subtype)에 걸쳐 유사한 조절을 나타내는 것으로 밝혀졌다. *KMT2A/MLL1*은 메닌-MLL 복합체의 구성원이며 H3K4 메틸화 및 전사 활성화를 담당한다(문헌 [Ruthenburg *et al.*, Molecular Cell 25 :15-30 (2007)], [Krivtsov *et al.*, Nat.Cancer 7:823-33 (2007)] 참조). 일부 구현예에서, 대상체는 *KIT* 유전자 내에 또는 주변에 돌연변이를 갖는 GIST로 진단된다. 일부 구현예에서, 돌연변이는 활성화 돌연변이이다. 활성화 돌연변이는 돌연변이된 단백질이 돌연변이 되지 않은 단백질에 비해 조절되지 않은 상태로 유지된다. 키나아제 도메인의 활성화 돌연변이는 대부분 리간드에 독립적인 키나아제 도메인의 활성화로 이어져, 표적 인산화를 초래한다. 일부 구현예에서, 상기 대상체는 전이성 GIST를 갖고 있다.

[0024] 본원에 사용된 용어 "대상체" (또는 "환자")는 GIST에 걸리기 쉽거나 (또는 걸리기 쉬운 경향이 있거나) 이를 앓고 있는 동물계의 모든 구성원을 포함한다. 일부 구현예에서, 대상체는 인간이다. 따라서, 본 개시에 따른 "GIST를 앓고 있는" 또는 치료를 "필요로 하는" 대상체는 이전에 1회 이상의 요법으로 치료를 받았을 수 있는 활성 질환을 갖는 대상체를 포함하여 양성 진단을 받은 대상체, 현재 치료를 받고 있지 않지만 (예를 들어, 병이 호전된 상태) 여전히 재발 위험이 있는 대상체, 및 양성 진단을 받지 않았지만 암이나 자가면역 질환에 걸리기 쉬운 대상 (예를 들어, 과거 병력 및/또는 가족 병력에 근거하여, 또는 기타 의료 전문가가 GIST에 걸리기 쉽다고 합리적으로 의심할 수 있는 하나 이상의 위험 요인이 있는 경우)을 광범위하게 포함한다.

[0025] 본원에 사용된 용어 "치료하다", "치료하는" 및 "치료"는 GIST와 관련된 생화학적 지표, 합병증 또는 건강상태, 또는 증상의 발병, 진행, 발달, 중증도 또는 재발을 역전, 완화, 개선, 억제, 감소, 둔화, 정지, 안정화 또는 예방의 치료적 목적 ("치료 효과")를 가지고 이를 필요로 하는 대상체에게 메닌 억제제, TKI 및/또는 MOZ 억제제의 유효량 또는 치료적 유효량에 대해 수행되는 모든 유형의 개입, 과정 또는 투여를 의미한다.

[0026] 본 개시의 실시예에 사용되는 활성화제는 메닌 억제제이다. 본원에 개시된 바와 같이, 일부 구현예에서, 티로신 키나아제 억제제(TKI) 및 MOZ (단핵구 백혈병 아연-핑거; 히스톤 아세틸트랜스퍼라제(HAT)인 라이신(K) 아세틸트랜스퍼라제 6A (KAT6A)로도 알려져 있음) 억제제를 포함하는 하나 이상의 추가 활성화제가 사용될 수 있다.

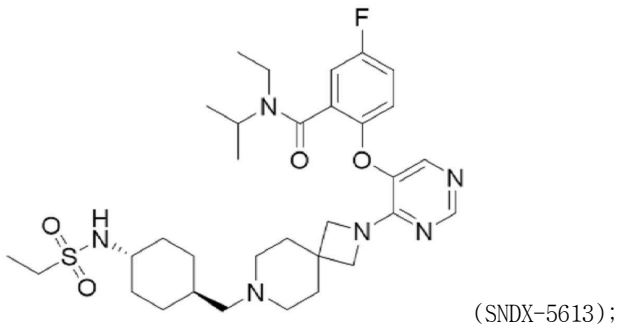
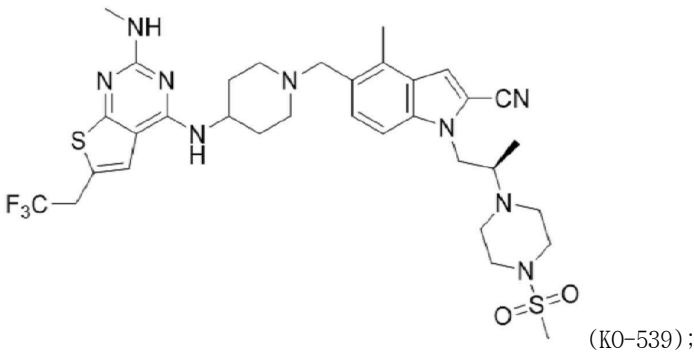
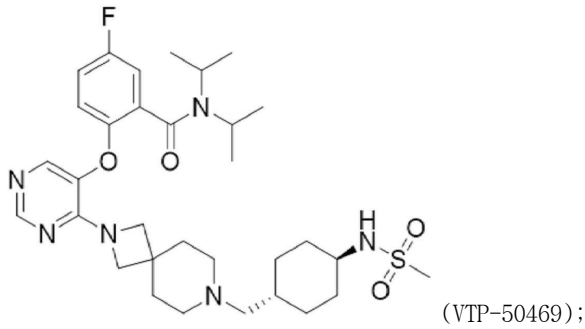
[0027] "억제제"라는 용어는 가장 넓은 의미로 사용되며, 직접적 또는 간접적으로 표적의 기능을 방해하고, 감소시키거나, 심지어는 표적의 기능을 제거하는, 소분자, 핵산 (예를 들어, 리보자임, 안티센스 핵산, siRNA), 항체 또는 이의 기능적 단편, 펩티드, 펩티도미메틱 또는 압타머와 같은, 임의의 작용제(agent)를 포함한다.

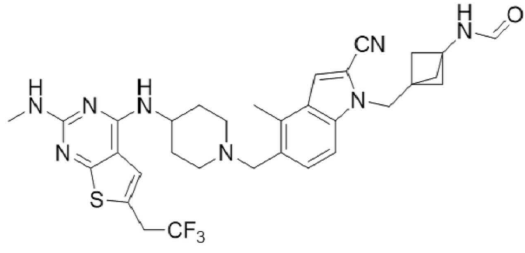
[0028] 메닌 억제제

[0029] 용어 "메닌 억제제", "메닌 억제제들" 및 "메닌-MLL 복합체 억제제"는 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 가장 넓은 의미로 이해될 수 있다. 메닌 억제제에는 메닌 단백질, 다발성 내분비 신생물 1 (*MEN1*) 유전자, 또는 메닌-MLL 복합체의 발현 또는 기능을 직접적 또는 간접적으로 방해하고 감소시키거나 심지어는 제거하는 작용을 하는, 소분자, 핵산 (예: siRNA), 또는 항체, 펩티드, 펩티도미메틱 또는 압타머와 같은, 임의의 작용제 또는 이의 조합을 포함한다. 단백질 파괴에는 직접적인 활성화 차단, 단백질-단백질 상호작용 차단 등이 포함될 수 있다. *MEN1* (다발성 내분비선종 증후군 1형) 유전자의 단백질 산물인 메닌은 MLL1 (라이신(K)-특이적 메틸트랜스퍼라제 2A (KMT2A)로도 알려져 있음), Ash2, Rbbp5 및 WDR5을 포함한 히스톤 메틸트랜스퍼라제 복합체의 혼합계통 백혈병(MLL) 계열 단백질과 상호작용한다. *MLL* 유전자의 염색체 재배열의 결과로, MLL은 60개 이상의 서로 다른 단백질 파트너 중 하나와 융합되어, 백혈병 발생에 중요한 *HOXA9* 및 *MEIS1* 유전자의 발현이 상향 조절된다. AML 또는 ALL과 달리, MLL 융합 단백질은 GIST에서 발생하지 않는다.

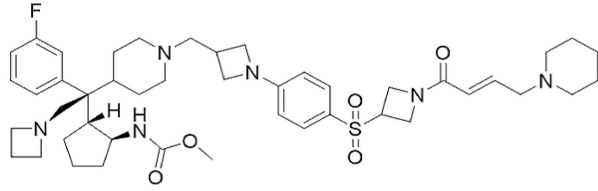
[0030] 대표적인 소분자 메닌 억제제는 VTP-50469 (5-플루오로-N,N-디이소프로필-2-((4-(7-(((1r,4r)-4-(메틸술폰아미도)사이클로헥실)메틸)-2,7-디아자스피로[3.5]노난-2-일)피리미딘-5-일)옥시)벤즈아미드), KO-539 ((R)-4-메틸-5-((4-(2-(메틸아미노)-6-(2,2,2-트리플루오로에틸)티에노[2,3-d]피리미딘-4-일)아미노)피페리딘-1-일)메틸)-1-(2-(4-(메틸술폰)피페라진-1-일)프로필)-1H-인돌-2-카르보니트릴, NCT04067336에서도 사용됨), JNJ-75276617 ((R)-N-에틸-5-플루오로-N-이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸핵산-3-일)-

2,6-디아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트리아진-6-일)옥시) 벤즈아미드, NCT04811560에서도 사용됨), SNDX-5613 (N-에틸-2-((4-(7-(((1r,4r)-4-(에틸술폰아미도)시클로헥실)메틸)-2,7-디아자스피로[3.5]노난-2-일)피리미딘-5-일)옥시)-5-플루오로-N-이소프로필벤즈아미드, NCT04065399에서도 사용됨), DS-1594 ((1R,2S,4R)-4-((4-(5,6-디메톡시피리다진-3-일)벤질)아미노)-2-(메틸(6-(2,2,2-트리플루오로에틸)티에노[2,3-d]피리미딘-4-일)아미노)사이클로펜탄-1-올, NCT04752163에서도 사용됨), BMF-219 ((R)-N-(1-(2-(2-((4-(4-모르폴리노-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-6-일)페닐)아미노)-2-옥소에틸)피리딘-4-일)피페리딘-3-일)부트-2-인아미드), DSP-5336 (N-에틸-5-플루오로-N-이소프로필-2-((5-(7-((1S,3S,4R)-5-메틸렌-2-아자비사이클로[2.2.2]옥탄-3-카르보닐)-2,7-디아자스피로[3.5]노난-2-일)-1,2,4-트리아진-6-일)옥시)벤즈아미드, NCT04988555에서도 사용됨), 항체 A300-105A (Bethyl Laboratories에서 상업적으로 이용가능함), MI-3453 (N-(3-((2-시아노-4-메틸-5-((4-(2-(메틸아미노)-6-(2,2,2-트리플루오로에틸)티에노[2,3-d]피리미딘-4-일)아미노)피페리딘-1-일)메틸)-1H-인돌-1-일)메틸)비사이클로[1.1.1]펜탄-1-일)포름아미드, M-808 (메틸((1S,2R)-2-((S)-2-(아제티딘-1-일)-1-(3-플루오로페닐)-1-(1-(1-(4-((1-(E)-4-(피페리딘-1-일)부트-2-에노일)아제티딘-3-일)술폰닐)페닐)아제티딘-3-일)메틸)피페리딘-4-일)에틸)사이클로펜탄)카바메이트), MI-0202 (4-(4-(5,5-디메틸-4,5-디히드로티아졸-2-일)피페라진-1-일)-6-(2,2,2-트리플루오로에틸)티에노[2,3-d]피리미딘), MI-503 (1-((1H-피라졸-4-일)메틸)-4-메틸-5-((4-(6-(2,2,2-트리플루오로에틸)티에노[2,3-d]피리미딘-4-일)아미노)피페리딘-1-일)메틸)-1H-인돌-2-카보니트릴), MI-463 (4-메틸-5-((4-(6-(2,2,2-트리플루오로에틸)티에노[2,3-d]피리미딘-4-일)아미노)피페리딘-1-일)메틸)-1H-인돌-2-카보니트릴), MI-136 (5-((4-(6-(2,2,2-트리플루오로에틸)티에노[2,3-d]피리미딘-4-일)아미노)피페리딘-1-일)메틸)-1H-인돌-2-카보니트릴) 및 ML-227 (4-(3-(4-(사이클로펜탄(하이드록시)(페닐)메틸)피페리딘-1-일)프로폭시)벤조니트릴)을 포함한다. 이러한 소분자 억제제의 구조는 다음과 같다:

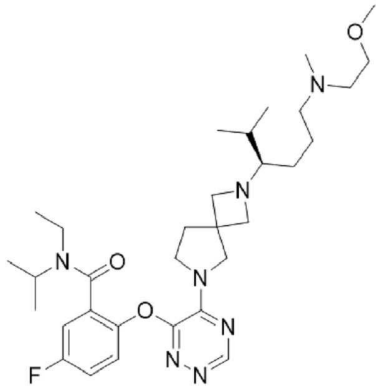




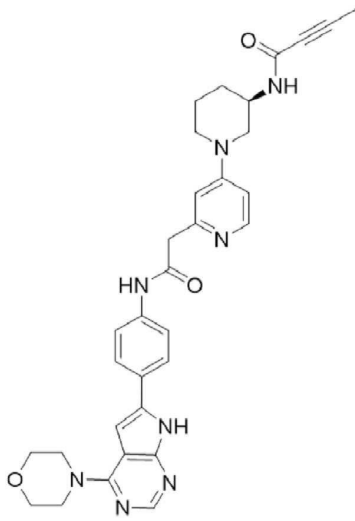
[0034] (MI-3454);



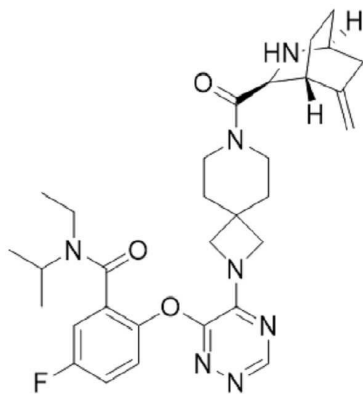
[0035] (M-808);



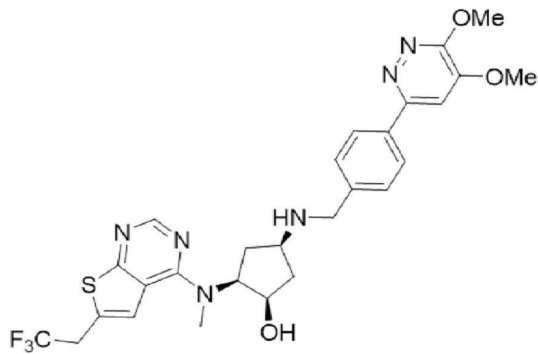
[0036] (JNJ- 75276617);



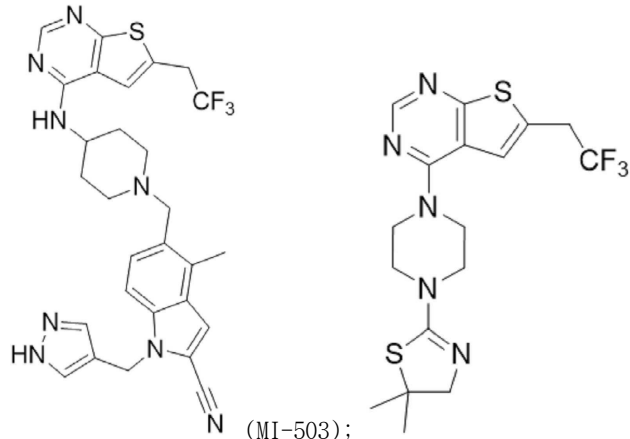
[0037] (BMF-219);



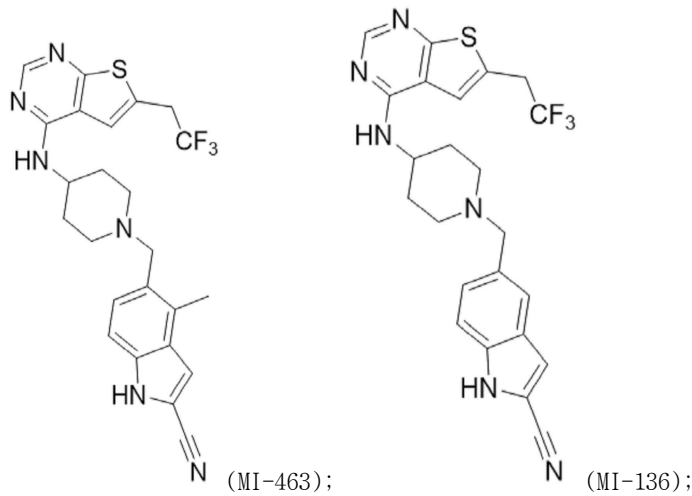
[0038] (DSP-5336);



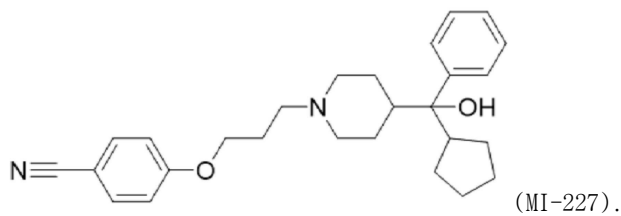
[0039] (DS-1594);



[0040] (MI-503); (MI-0202);



[0041] (MI-463); (MI-136);



[0042] (MI-227).

[0043] 본 개시의 실시예에 유용할 수 있는 다른 메닌 억제제는 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, WO 2017/112768, WO 2017/214367, WO 2018/053267, WO 2020/069027 A1, WO 2021/207335 A1, U.S. 2021/0115018 A1, U.S. 2019/0307750, U.S. 20160339035(여기서 화학식 (I)의 화합물), 및 문헌 [Borkin et al., Cancer Cell 27(4): 589-602 (2015)] 참조.

[0044] 본 개시의 실시예에 유용할 수 있는 추가의 메닌 억제제에는 메닌과 MLL 사이의 상호작용을 억제하는 MI-2-2이 포함된다 (문헌 [Grembecka et al., Nat. Chem. Biol. 8:277-284 (2012)]; [Shi et al., Blood 120:4461-4469 (2102)]), 및 N,N'-비스(4-아미노페닐)-N,N'-디메틸에틸렌디아민 (ISC-30으로도 알려져 있으며 MLL 효소 및 메

닌의 상호작용을 억제함), 및 문헌 [Krivtsov et al., Cancer Cell. 36(6):660-673 (2019)], [Klossowski et al., J. Clin. Invest. 130:981-97 (2020)], [Xu et al., J. Med. Chem. 63:4997-5010 (2020)].

[0045] 일부 구현예에서, 메닌 억제제는 *MEN1*의 수준 또는 또 다른 메닌-MLL 복합체 구성원의 수준을 감소시키기 위한 활성제로서 사용되는 간섭 RNA, 예를 들어 짧은 간섭 RNA (siRNA)이다. RNA 간섭(RNAi)은 다양한 유기체 및 세포 유형에 이중 가닥 RNA(dsRNA)를 도입하면 상보적인 mRNA가 분해되는 현상이다. 문헌 [Soutschek et al., 432 :173-178(2004)]은 정맥 내 전신 전달을 돕는 siRNA의 화학적 변형을 기술하고 있다. siRNA 최적화하려면 전체 G/C 함량, 말단의 C/T 함량, 용융 온도(Tm) 및 3' 오버행의 뉴클레오티드 함량을 고려해야 한다. 예를 들어, 문헌 [Schwartz et al., Cell 115 :199-208 (2003)] 및 [Khvorovae et al., Cell 115 :209-216(2003)]을 참조할 수 있다. 따라서, 본 개시는 또한 RNAi 기술을 사용하여 *MEN1*, *MOZ* 또는 다른 표적 단백질의 수준을 감소시키는 방법을 포함한다. 메닌-MLL 복합체의 구성원에 결합하는 대표적인 siRNA의 핵산 서열은 표 1에 제시되어 있다.

[0046] 표 1: 메닌-MLL 복합체-결합 siRNA의 핵산 서열

| 올리고뉴클레오티드 | 서열 (5'→3') |
|---------------|--|
| sgKMT2A_A_For | CACCGAGGGGCTTAATGATCCGCG (SEQ ID NO: 1) |
| sgKMT2A_A_Rev | AAACCGCGGATCATTAAGACCCCTC (SEQ ID NO: 2) |
| sgKMT2A_B_For | CACCGATCCTTCTACTTGCATGGG (SEQ ID NO: 3) |
| sgKMT2A_B_Rev | AAACCCCATGCAAGTAGAAGGATCC (SEQ ID NO: 4) |
| sgMEN1_A_For | CACCGACGTCGTCGATGGAGCGCAG (SEQ ID NO: 5) |
| sgMEN1_A_Rev | AAACGTCGCTCCATCGACGCGTC (SEQ ID NO: 6) |
| sgMEN1_B_For | CACCGAGAGGGCGGCGATGATAGAC (SEQ ID NO: 7) |
| sgMEN1_B_Rev | AAACGTCTATCATCGCCGCCCTCTC (SEQ ID NO: 8) |

[0047]

[0048] 메닌 억제제는 단독 요법으로 또는 병용 요법 (예를 들어, TKI 및/또는 MOZ 억제제와 병용)으로 환자에게 투여될 수 있다. 단독 및 병용 요법은 이전에 항-GIST 암 치료 요법을 받은 적이 없는 환자의 초기 치료로서 단독 또는 다른 치료와 병용하는 "1차(front/first-line)" 치료, 이전에 항암 치료 요법을 받은 적이 있는 환자의 치료로서 단독 또는 다른 치료와 병용하는 "2차" 치료, 또는 단독 또는 다른 치료와 병용하는 "3차", "4차" 등의 치료일 수 있다. 이전에 치료에 실패했거나 부분적으로 성공했지만 특정 치료를 견딜 수 없게 된 환자에게도 요법이 제공될 수 있다. 요법은 또한 보조 치료, 즉, 현재 발견할 수 있는 질환이 없는 환자 또는 종양의 수술적 제거 후 GIST의 재발을 예방하기 위해 제공될 수도 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 억제제(들)은 화학요법, 방사선면역요법, 수술 요법, 면역요법, 방사선 요법, 표적 요법 또는 이들의 임의의 조합과 같은 다른 요법을 받은 환자에게 투여될 수 있다.

[0049] 티로신 키나아제 억제제(TKI) 및/또는 MOZ 억제제와의 병용 요법

[0050] 일부 구현예에서, 대상체는 TKI 및/또는 MOZ 억제제의 유효량 또는 치료적 유효량과 조합하여 또는 동시에 메닌 억제제 요법을 통해 치료된다. KIT 또는 MOZ를 차단하는 것은, 메닌 억제제의 치료 효과를 높일 수 있는 추가적인 수단이 될 수 있다.

[0051] 병용 요법의 맥락에서 사용된 용어 "병용" 및 "동시적으로(concurrently)"는 활성제가 실질적으로 공동-투여된다는 것을 의미하며, 이는 동일하거나 별도의 제형, 동일하거나 상이한 투여 방식, 또는 순차적으로, 예를 들어, 동일한 치료 요법의 일부로서 또는 연속적인 치료 요법의 방식으로 투여되는 것이 포함된다. 따라서, 순차적으로 투여하는 경우, 두 번째 억제제의 투여 개시 시, 첫 번째 억제제는 일부 경우에 치료 부위에서 여전히 유효 농도로 검출될 수 있다. 순서 및 시간 간격은 함께 작용하여 (예를 들어, 상승작용에 의해) 달리 투여되는 경우보다 증가된 혜택(benefit)을 제공할 수 있도록 결정할 수 있다. 예를 들어, 치료제는 동시에 또는 서로 다른 시점에 임의의 순서로 순차적으로 투여될 수 있으며; 그러나, 동시에 투여하지 않는 경우에는 원하는 치료 효과를 제공할 수 있도록 충분히 가까운 시간에 투여할 수 있으며, 이는 시너지 방식이 될 수 있다. 따라서, 이 용어는 활성제를 정확히 동시에 투여하는 것으로 제한되지 않는다.

[0052] 티로신 키나아제 억제제

[0053] TKI에는 KIT 단백질, 또는 *KIT*의 기능 또는 발현을 직접적 또는 간접적으로 방해하고, 감소 또는 심지어는 제거하기 위해 작용하는, 소분자, 핵산 (예를 들어, siRNA), 또는 항체, 펩티드, 펩티도미메틱 또는 압타머와 같은 작용제 중 임의의 하나 또는 이의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, TKI는 이마티닙, 수니티닙, 레고라페닙,

아바프리티닙, 리프레티닙 또는 닐로티닙이다. TKI는 항체, 예를 들어, 항-KIT 항체인 단일클론 항-D4 및 항-D5 일 수 있다. 문헌 [Shi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 113(33):E4784-93 (2016)]을 참조할 수 있다. 일부 구현예에서, KIT 억제제는 항체 단편, 예를 들어, 2가 항체 단편 2D1-Fc 및 3G1-Fc이다. 문헌 [Gall et al., Mol. Cancer. Ther. 14(11):2595-605 (2015)]을 참조할 수 있다. 두 가지 이상의 TKI 억제제를 조합하여 사용할 수 있다.

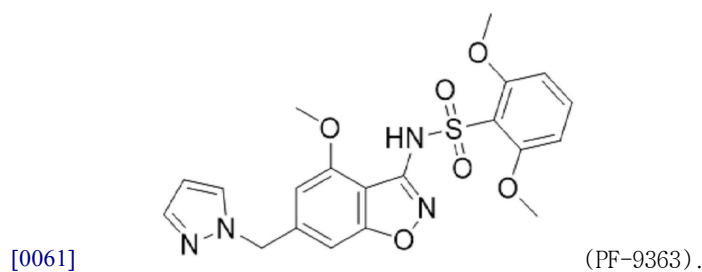
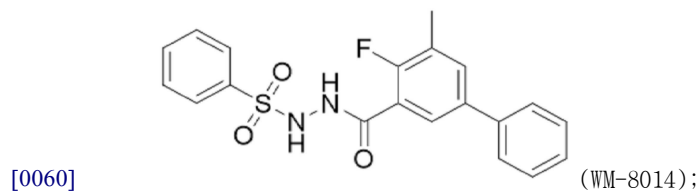
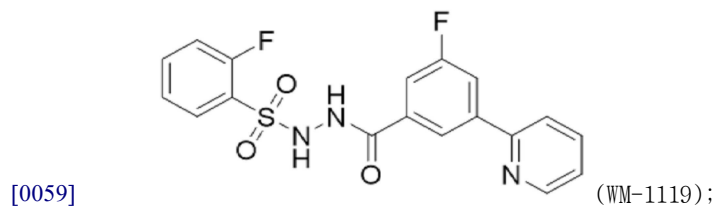
[0054] 일부 구현예에서, TKI는 메닌 억제제 투여 이후에 투여된다. 일부 구현예에서, TKI는 메닌 억제제의 투여와 실질적으로 동시에(simultaneously) (즉, 동시적으로(concurrently)) 투여된다. 일부 구현예에서, TKI는 메닌 억제제 투여 전에 투여된다.

[0055] MOZ 억제제

[0056] 일부 구현예에서, 추가 활성제는 유효량의 MOZ 억제제일 수 있다. 일부 구현예에서, 추가 활성제는 치료적 유효량의 MOZ 억제제일 수 있다. MOZ 억제제에는 MOZ 단백질 또는 MOZ 유전자의 기능 또는 발현을 직접적 또는 간접적으로 방해하고 감소하거나 심지어 제거하기 위해 작용하는, 소분자, 핵산(예: siRNA), 또는 항체, 펩티드, 펩티도미메틱 또는 압타머와 같은 임의의 작용제 중 하나 또는 이의 조합이 포함된다. 일부 구현예에서, MOZ 억제제는 메닌 억제제 투여 이후에 투여된다. 일부 구현예에서, MOZ 억제제는 메닌 억제제의 투여와 실질적으로 동시에 투여된다. 일부 구현예에서, 메닌 억제제는 TKI 및 MOZ 억제제 둘 다와 병용된다. 일부 구현예에서, TKI는 MOZ 억제제 투여 후에 투여된다. 일부 구현예에서, TKI는 MOZ 억제제의 투여와 실질적으로 동시에 투여된다.

[0057] 본 개시의 실시예에 유용할 수 있는 MOZ 억제제의 대표적인 예에는 WM-1119 (2-플루오로-N'-(3-플루오로-5-(피리딘-2-일)벤조일)벤젠술포노히드라지드), WM-8014 (N'-(4-플루오로-5-메틸-[1,1'-비페닐]-3-카보닐)벤젠술포노히드라지드), PF-9363 (N'-(4-플루오로-5-메틸-[1,1'-비페닐]-3-카보닐)벤젠술포노히드라지드) 및 항체 21620002 (Novus Biologicals에서 상업적으로 입수가능함)가 포함된다.

[0058] 이들 대표적인 소분자 MOZ 억제제의 구조는 다음과 같다:



[0062] 일부 구현예에서, MOZ 억제제는 MOZ 수준 또는 또 다른 MOZ 복합체 구성원의 수준을 감소시키기 위해 활성제로서 사용되는 간접 RNA (예를 들어, siRNA)이다. MOZ 복합체의 구성원에 결합하는 대표적인 siRNA의 핵산 서열은 표 2에 기재되어 있다:

[0063] 표 2: MOZ 복합체-결합 siRNA의 핵산 서열

| 올리고뉴클레오티드 | 서열 (5'-->3') |
|---------------|---|
| sgBRPF1_A_For | CACCGGCTTAGTCGCCCCGAAGTTG (SEQ ID NO: 9) |
| sgBRPF1_A_Rev | AAACCAACTTGGGGCGACTAAGCC (SEQ ID NO: 10) |
| sgBRPF1_B_For | CACCGAGGCGACCCTAATGCGCTAG (SEQ ID NO: 11) |
| sgBRPF1_B_Rev | AAACCTAGCGCATTAGGGTCGCCTC (SEQ ID NO: 12) |
| sgKAT6A_A_For | CACCGTGATAGCCAATCGTAACTGC (SEQ ID NO: 13) |
| sgKAT6A_A_Rev | AAACGCAGTTACGATTGCTATCAC (SEQ ID NO: 14) |
| sgKAT6A_B_For | CACCGTCACTCGAACCGTTAGTTCA (SEQ ID NO: 15) |
| sgKAT6A_B_Rev | AAACTGAACTAACGGTTCGAGTGAC (SEQ ID NO: 16) |
| sgMEAF6_A_For | CACCGCATGGCGATGCACAACAAGG (SEQ ID NO: 17) |
| sgMEAF6_A_Rev | AAACCCCTGTTGTGCATCGCCATGC (SEQ ID NO: 18) |
| sgMEAF6_B_For | CACCGGCGGCTCTTCAGTAAATCCT (SEQ ID NO: 19) |
| sgMEAF6_B_Rev | AAACAGGATTTACTGAAGAGCCGCC (SEQ ID NO: 20) |

[0064]

[0065] 일부 구현예에서, MOZ 억제제는 메닌 억제제 투여 이후에 투여된다. 일부 구현예에서, MOZ 억제제는 메닌 억제제의 투여와 실질적으로 동시에 (즉, 동시에) 투여된다. 일부 구현예에서, MOZ 억제제는 메닌 억제제 투여 전에 투여된다.

[0066] TKI 및 MOZ 억제제 (메닌 억제제에 추가하여)의 투여를 수반하는 구현예와 관련하여, MOZ 억제제는 TKI 투여 이전에, 실질적으로 동시에, 또는 투여 이후에 투여될 수 있다.

[0067] 일부 구현예에서, MOZ 억제제는 TKI 및 메닌 억제제의 투여 이후에 투여된다. 일부 구현예에서, MOZ 억제제는 TKI 및 메닌 억제제의 투여와 실질적으로 동시에 (즉, 동시적으로) 투여된다. 일부 구현예에서, 메닌 억제제는 MOZ 억제제 및 TKI의 투여 이후에 투여된다.

[0068] 조성물 및 제형

[0069] 본원에 기술된 활성제는 공지된 기술에 따라 약제학적 조성물로 제형화될 수 있다. 본 개시의 약제학적 조성물은 유효량의 메닌 억제제를 단독으로 포함하거나, 또는 유효량의 TKI 및 MOZ 억제제를 병용으로 포함한다. 일부 구현예에서, 본 개시의 약제학적 조성물은 유효량 또는 치료적 유효량의 메닌 억제제를 단독으로 포함하거나, 또는 유효량 또는 치료적 유효량의 TKI 및 MOZ 억제제를 병용으로 포함한다. 활성제(들)는 약제학적으로 허용되는 염 또는 이의 이성질체 (예를 들어, 입체 이성질체)의 형태일 수 있다. 염 및 입체 이성질체는 "억제제(들)" 및 "활성제(들)"라는 용어에 포함된다. 본원에 사용된 "약제학적으로 허용되는 염"은 수용자에게 투여 시 본 개시의 화합물 또는 화합물의 프로드러그를 직접적으로 또는 간접적으로 제공할 수 있는 임의의 무독성 염을 의미한다. 약제학적으로 허용되는 염은 산에 의해 형성될 수 있으며, 대표적인 예로는 염산, 황산, 아세트산, 젖산, 타르타르산, 말산 및 숙신산을 포함한다.

[0070] 본원에 개시된 활성제 및 이의 약제학적으로 허용되는 염 및 입체 이성질체는 개별적으로 또는 함께, 둘 이상의 조합으로, 통상적인 혼합, 용해, 과립화, 당의정 제조(dragee-making), 레비게이팅(levigating), 유화, 캡슐화, 포획 및 압축 프로세스와 같은 통상적인 약제학적 실시예에 따라 주어진 유형의 조성물로 제형화될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20th ed.), ed. A. R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, 2000] 및 [Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick and J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, New York] 참조). 제형의 유형은 장관 (예를 들어, 경구, 협측, 설하 및 직장), 비경구 (예를 들어, 피하(s.c.), 정맥내(i.v.), 근육내(i.m.) 및 흉골내 주사, 또는 주입 기술, 안구내, 동맥내, 골수내, 척추강내, 뇌실내, 경피, 피간, 질내, 복강내, 점막, 비강, 기관내 점적, 기관지 점적 및 흡입) 및 국소 (예를 들어, 경피)를 포함할 수 있는 투여 방식에 따라 다르다. 일반적으로, 가장 적절한 투여 경로는, 예를 들어, 제제의 특성 (예를 들어, 위장관 환경에서의 안정성) 및/또는 대상체의 상태 (예를 들어, 대상체가 경구 투여를 견딜 수 있는지 여부)를 포함하는 다양한 요인에 따라 달라진다. 예를 들어, 비경구 (예를 들어, 정맥내) 투여는 또한 단일 용량 치료 및/또는 급성 병태(condition)의 경우와 같이 억제제를 비교적 신속하게 투여할 수 있다는 점에서 유리할 수 있다.

[0071] 일부 구현예에서, 활성제는 경구 또는 정맥내 투여 (예를 들어, 전신 정맥내 주사)를 위해 제형화된다.

- [0072] 따라서, 본 발명의 활성제는 고체 조성물 (예를 들어, 분말, 정제, 분산성 과립, 캡슐, 카세트(cachets) 및 좌제), 액체 조성물 (예를 들어, 억제제가 용해된 용액, 억제제의 고체 입자가 분산된 현탁액, 에멀전 및 리포솜, 미셀 또는 나노 입자를 함유하는 용액, 시럽 및 엘릭서), 반고체 조성물 (예를 들어, 젤, 현탁액 및 크림) 및 기체 (예를 들어, 에어로졸 조성물용 추진제)로 제형화될 수 있다. 억제제는 또한 신속, 중간 또는 연장 방출용으로 제형화될 수 있다.
- [0073] 경구 투여를 위한 고체 제형에는 캡슐, 정제, 환제, 분말 및 과립을 포함한다. 이러한 고체 제형에서, 활성 억제제는 구연산나트륨 또는 인산이칼슘과 같은 담체 및 추가적인 담체 또는 부형제, 예컨대, a) 전분, 락토스, 수크로스, 글루코스, 만니톨 및 규산과 같은 충전제 또는 증량제, b) 예를 들어, 메틸셀룰로오스, 미세결정질 셀룰로오스, 하이드록시프로필메틸셀룰로오스, 카복시메틸셀룰로오스, 나트륨 카복시메틸셀룰로오스, 알기네이트, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈, 수크로스 및 아카시아와 같은 바인더(binder), c) 글리세롤과 같은 습윤제, d) 가교 폴리머 (예를 들어, 가교 폴리비닐피롤리돈(크로스포비돈), 가교 나트륨 카복시메틸 셀룰로오스 (크로스카멜로스 나트륨), 나트륨 전분 글리콜레이트, 한천-한천, 탄산 칼슘, 감자 또는 타피오카 전분, 알긴산, 특정 규산염 및 탄산 나트륨과 같은 붕해제, e) 과라핀과 같은 용해 지연제, f) 4차 암모늄 화합물과 같은 흡수 촉진제, g) 세틸 알코올 및 글리세롤 모노스테아레이트와 같은 습윤제, h) 카올린 및 벤토나이트 점토와 같은 흡수제, 및 i) 활석, 칼슘 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 고체 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 라우릴 황산염과 같은 윤활제 및 이들의 혼합물과 혼합된다. 캡슐, 정제 및 환제의 경우, 제형에는 완충제가 포함될 수도 있다. 유사한 유형의 고체 조성물은 또한 락토오스 또는 유당뿐만 아니라 고분자량 폴리에틸렌 글리콜 등과 같은 부형제를 사용하여 연질 및 경질 충전 젤라틴 캡슐의 충전제로 사용될 수 있다. 정제, 당의정, 캡슐, 환제 및 과립의 고체 제형은 장용 코팅 및 기타 코팅과 같은 코팅 및 셸(shell)을 사용하여 제조될 수 있으며, 불투명화제를 추가로 함유할 수 있다.
- [0074] 일부 구현예에서, 본 개시의 억제제는 젤라틴 캡슐과 같은 경질 또는 연질 캡슐로 제형화될 수 있다. 사용될 수 있는 대표적인 부형제로는 전젤라틴화 (pregelatinized) 전분, 스테아르산 마그네슘, 만니톨, 푸마르산 스테아릴 나트륨, 무수 락토오스, 미결정 셀룰로오스 및 크로스카멜로스 나트륨이 포함된다. 젤라틴 셸에는 젤라틴, 이산화티타늄, 산화철 및 착색제가 포함될 수 있다.
- [0075] 경구 투여용 액체 제형에는 용액, 현탁액, 에멀전, 마이크로-에멀전, 시럽 및 엘릭서가 포함된다. 억제제 이외에, 액체 제형은 당업계에서 일반적으로 사용되는 수성 또는 비수성 담체 (억제제의 용해도에 따라 다름), 예컨대, 예를 들어, 물 또는 기타 용매, 가용화제 및 유화제, 예컨대, 에틸 알코올, 이소프로필 알코올, 에틸 카보네이트, 에틸아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜, 디메틸포름아미드, 오일 (특히, 목화씨, 땅콩, 옥수수, 배아유, 올리브유, 피마자유 및 참기름), 글리세롤, 테트라하이드로푸르푸릴 알코올, 폴리에틸렌 글리콜 및 소르비탄의 지방산 에스테르, 및 이들의 혼합물을 함유할 수 있다. 경구 조성물은 또한 습윤제, 현탁제, 착색제, 감미제, 향미제 및 향료와 같은 부형제를 포함할 수도 있다.
- [0076] 주사 가능한 제제에는 멸균 수용액 또는 유성 현탁액이 포함될 수 있다. 이는 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁제를 사용하여 표준 기술에 따라 제제화될 수 있다. 멸균 주사용 제제는 비경구적으로 허용되는 비독성 희석제 또는 용매 (예를 들어 1,3-부탄디올) 중의 멸균 주사용 용액, 현탁액 또는 에멀전일 수도 있다. 사용할 수 있는 허용되는 비히클 및 용매로는 물, 링거액, U.S.P., 및 등장성 염화나트륨 용액 등을 들 수 있다. 또한, 멸균 고정유는 용매 또는 현탁 매질로서 통상적으로 사용된다. 이를 위해, 합성 모노- 또는 디-글리세리드를 비롯한 임의의 무자극성 고정유를 사용할 수 있다. 또한, 올레산과 같은 지방산은 주사 가능한 제제의 제조에 사용된다. 주사 가능한 제제는, 예를 들어, 박테리아-보유 필터를 통한 여과에 의해, 또는 사용 전에 멸균수 또는 기타 멸균 주사용 매질에 용해되거나 분산될 수 있는 멸균 고체 조성물 형태의 멸균제를 혼입함으로써 멸균될 수 있다. 화합물의 효과는 흡수 속도를 늦춤으로써 연장될 수 있으며, 이는 액체 현탁액이나 수용성이 낮은 결정질 또는 비정질 물질을 사용하여 달성할 수 있다. 비경구 투여 제제로부터 억제제의 장기간 흡수는 또한 억제제를 유성 비히클에 현탁시킴으로써 달성될 수 있다.
- [0077] 투여량
- [0078] 본원에 사용된 용어 "유효량" 및 "치료적 유효량"은 본원에 개시된 활성제 (예를 들어, 메닌 억제제, TKI 또는 MOZ 억제제) 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이성질체의, GIST 환자에서 원하는 반응을 이끌어내는 데 효과적인 양을 의미한다. 따라서, "유효량" 및 "치료적 유효량"이라는 용어는 투여 시, GIST에서 긍정적인 변화를 유도하거나, GIST의 발생 또는 진행을 억제하거나, GIST의 증상 중 하나 이상을 어느 정도 완화시키기에 충분하거나, 단순히 GIST의 성장을 멈추게하거나 억제하거나 질병 세포에서 메닌-MLL 복합체의 활성을 차단하거

나 감소시키는 활성제의 양을 포괄한다. 활성제의 유효량은 GIST의 중증도 및 단계, 투여 방식, 대상체의 연령, 체중 및 전반적인 건강 상태, 및 의학 분야에 잘 알려진 요인을 포함할 수 있는 여러 요인에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Goodman and Gilman's, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10th Edition, A. Gilman, J. Hardman and L. Limbird, eds., McGraw-Hill Press, 155-173, 2001]을 참조할 수 있다. 궁극적으로, 주치의나 수의사가 적절한 양 및 투여 계획(dosage regimen)을 결정할 것이다.

- [0079] 본 개시의 실시예에 유용한 활성제는 넓은 투여량 범위에 걸쳐 효과적일 수 있다. 일부 구현예에서, 총 일일 투여량 (예를 들어, 성인 인간의 경우)은 약 0.001 내지 약 1600 mg, 0.01 내지 약 1600 mg, 0.01 내지 약 500 mg, 약 0.01 내지 약 100 mg, 약 0.5 내지 약 100 mg, 1일 1 내지 약 100-400 mg, 1일 약 1 내지 약 50 mg, 및 1일 약 5 내지 약 40 mg, 또 다른 구현예에서는 1일 약 10 내지 약 30 mg 범위일 수 있다. 개별 투여량은 활성제가 하루에 투여되는 횟수에 따라 원하는 투여량을 함유하도록 제형화될 수 있다. 예로서, 캡슐은 약 1 내지 약 200 mg의 활성제 (예를 들어, 1, 2, 2.5, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 150, 및 200 mg)로 제형화될 수 있다. 일부 구현예에서, 개별 투여량은 활성제가 하루에 투여되는 횟수에 따라 원하는 투여량을 함유하도록 제형화될 수 있다.
- [0080] 일부 구현예에서, 메닌 억제제의 적합한 일일 투여량은 체중의 1mg/kg 내지 약 200mg/kg, 약 1µg/kg 내지 약 100mg/kg, 또는 약 1mg/kg 내지 약 50mg/kg 범위일 수 있다. 메닌 억제제의 다른 투여량은 관련 기술분야에 개시되어 있다. 예를 들어, 국제출원 공보 WO 2017/112768, WO 2017/214367, WO 2018/053267, WO 2020/069027 A1, WO 2021/207335 A1, 및 U.S. 특허 출원 공보 제2021/0115018 A1호 및 제2019/0307750호를 참조할 수 있다.
- [0081] 일부 구현예에서, TKI 이마티닙의 1일 투여량은 약 100 mg/일이다. 일부 구현예에서, KIT 억제제는 약 300 mg/일, 약 340 mg/일, 약 400 mg/일, 약 600 mg/일, 또는 약 800 mg/일의 1일 투여량으로 투여된다.
- [0082] 일부 구현예에서, TKI 수니티닙의 1일 투여량은 약 50mg, 예를 들어 4주 동안 1일 1회 경구 투여한 후 2주 동안 치료하지 않고, 전형적으로 12.5, 25, 또는 50mg의 수니티닙을 함유하는 경질 젤라틴 캡슐의 형태이다.
- [0083] 일부 구현예에서, TKI 레고라페닙의 1일 투여량은 약 160mg (예를 들어, 21일 동안 경구 투여한 후 1주 휴약, 전형적으로 40mg-필름 코팅 정제 형태)이다.
- [0084] 일부 구현예에서, TKI 아바프리티닙의 1일 투여량은 약 300mg (예를 들어, 1일 1회 경구, 전형적으로 25, 50, 100, 200 또는 300mg을 함유하는 필름 코팅 캡슐 형태)이다.
- [0085] 일부 구현예에서, TKI 리프레티닙의 1일 투여량은 약 150mg (예를 들어, 1일 1회 경구, 전형적으로 50mg 정제 형태)이다.
- [0086] 일부 구현예에서, TKI 닐로티닙의 일일 투여량은 약 300-400 mg (예를 들어, 150 및 200 mg 경질 캡슐, 전형적으로 공복에 대략 12시간 간격으로 1일 2회 복용)이다.
- [0087] 일부 구현예에서, MOZ 억제제의 일일 투여량은 대상체 체중 1kg당 약 0.5 µg 내지 약 50mg 범위일 수 있다. 일부 구현예에서, MOZ 억제제의 투여량은 대상체의 체중 1kg당 약 1µg 내지 약 10mg 범위일 수 있고, 일부 구현예에서는, 대상체의 체중 1kg당 약 3 µg 내지 약 1mg일 수 있다.
- [0088] 이 방법은 메닌 억제제, 및 선택적으로 하나 이상의 추가 활성제 또는 이의 약제학적 조성물을 환자에게 단일 용량 또는 다중 용량 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 15, 20회 또는 그 이상의 투여량)으로 투여하는 것을 수반할 수 있다. 예를 들어, 투여 빈도는 1일 1회부터 약 8주마다 1회까지 다양할 수 있다. 일부 구현예에서, 투여 빈도는 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6주 동안 1일 1회 정도이며, 다른 구현예에서는 3주 (21일) 동안 매일 투여한 후 7일간의 "휴약" 기간을 포함하는 28-일 사이클 또는 4주 동안 투여한 후 14일간의 "휴약" 기간을 포함한다. 다른 구현예에서, 활성제(들)은 2일 반 동안 하루에 두 번(BID) 투여하거나 (총 5회 투여), 또는 2일 동안 하루에 한 번(QD) 투여 (총 2회 투여) 할 수 있다. 다른 구현예에서, 활성제(들)은 5일 동안 1일 1회 (QD) 투여될 수 있다.
- [0089] 추가적인 병용 요법
- [0090] 본 방법은 적어도 하나의 다른 활성 항암제의 투여를 수반할 수 있다. 대표적인 항암제는 미국 특허 제 9,101,622호 (섹션 5.2)에 개시되어 있다.
- [0091] 그러나 다른 치료법에는 면역요법, 화학요법 및 방사선요법이 포함된다.

- [0092] 진단된 암을 치료하기 위해 면역 체크포인트 억제제를 포함한 면역요법을 사용할 수 있다. 면역 체크포인트 분자에는, 예를 들어, PD1, CTLA4, KIR, TIGIT, TIM-3, LAG-3, BTLA, VISTA, CD47 및 NKG2A가 포함된다. 임상적으로 이용 가능한 면역 체크포인트 억제제의 예로는 더발루맵 (Imfinzi®), 아테졸리주맵 (Tecentriq®) 및 아벨루맵 (Bavencio®)이 포함된다. 임상적으로 이용 가능한 PD1 억제제의 예로는 니볼루맵 (Opdivo®), 펌브롤리주맵 (Keytruda®) 및 세미플리맵 (Libtayo®)이 포함된다.
- [0093] 병용 화학요법에는, 예를 들어, 아브락산®, 알트레타민, 도세탁셀, 허셉틴®, 메토트렉세이트, 노반트론®, 졸라텍스®, 시스플라틴 (DDP), 카르보플라틴, 프로카르바진, 메클로르에타민, 사이클로포스파미드, 캄프토테신, 이포스파미드, 펠팔란, 클로람부실, 부셀판, 니트로수레아, 닥티노마이신, 다우노루비신, 독소루비신, 블레오마이신, 플리코마이신, 미토마이신, 에토포시드 (VP16), 타목시펜, 탈록시펜, 에스트로겐 수용체 결합제, 탁솔®, 켄시타비엔, 나벨빈®, 파나실-단백질 탄수화물 억제제, 트랜스플라티늄, 5-플루오로우라실, 빈크리스틴, 빈블라스틴 및 메토트렉세이트, 또는 전술한 것의 임의의 유사체 또는 유도체 변이체 및 이들의 조합을 포함한다.
- [0094] 병용 방사선 치료에는 일반적으로 알려진 감마선, X선 및/또는 중양 세포에 방사성 동위원소를 직접 전달하여 DNA, DNA 복제 및 복구, 염색체의 조립 및 유지에 광범위한 손상을 일으키는 방사성 동위원소 치료가 포함된다. 방사성 동위원소의 투여량 범위는 동위원소의 반감기, 방출되는 방사선의 강도와 유형, 신생물(neoplastic) 세포의 흡수 정도에 따라 매우 다양하며, 주치의에 의해 결정된다.
- [0095] 방사선 치료에는 외부 또는 내부 방사선 치료가 포함될 수 있다. 외부 방사선 치료는 대상체의 신체 외부에 있는 방사선원을 사용하여 신체 내 암 부위를 향해 방사선을 보낸다. 내부 방사선치료는 암 내부 또는 근처에 직접 배치되는 바늘, 씨드(seed), 와이어 또는 카테터에 밀봉된 방사성 물질을 사용한다.
- [0096] 키트
- [0097] 약제학적 조성물은 GIST 치료에 사용하기 위한 키트 또는 약제학적 시스템으로 조립될 수 있다. 키트 또는 약제학적 시스템은 적합한 용기, 예를 들어, 튜브, 바이알, 앰플, 병, 주사기 또는 백에 배치된 메닌 억제제 및 약제학적으로 허용되는 담체를 함유하는 하나 이상의 투여 제형을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 키트 또는 약제학적 시스템은 또한 TKI의 하나 이상의 투약 제형을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 키트 또는 약제학적 시스템은 또한 MOZ 억제제의 하나 이상의 투약 제형을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 키트 또는 약제학적 시스템은 또한 TKI 억제제의 하나 이상의 투약 제형 및 MOZ 억제제의 하나 이상의 투약 제형을 포함할 수 있다. 추가 활성제는 별도로 또는 함께 제형화될 수 있으며, 동일하거나 별도의 용기에 배치될 수 있다. 본 개시의 키트 또는 약제학적 시스템은 또한 그 안에 함유된 추가 활성제(들)를 사용하기 위한 인쇄된 지침을 포함할 수도 있다.
- [0098] 일부 구현예에서, 키트는 동일한 제형의 메닌 억제제 및 TKI를 포함한다. 다른 구현예에서, 메닌 억제제 및 TKI는 상이한 제형에 함유된다.
- [0099] 본 개시의 이러한 측면 및 다른 측면은, 본 개시의 특정 구현예를 설명하기 위한 것이지만 청구범위에 정의된 바와 같이 그 범위를 제한하려는 것이 아니고, 다음 실시예를 고려하면 더욱 잘 이해될 것이다.
- [0100]
- [0101] 실시예
- [0102] 실시예 1: 재료 및 방법
- [0103] 세포 배양 및 바이러스 생산. 모든 세포주는 임상적 감시 (MilliporeSigma Cat# MP0025-1KT)에서 마이코플라스마 감염에 대해 음성으로 테스트하였다. 인간 배아 신장(HEK) 293FT (Thermo Fisher Scientific Cat# R70007, RRID: CVCL_6911) 및 GIST 세포주 GIST-T1 (Cosmo Bio Cat# PMC-GIST01-COS, RRID:CVCL_4976; 엑손 11의 KIT 돌연변이 Δ560-578), GIST430(RRID: CVCL_7040; 엑손 11 Δ560-576의 KIT 돌연변이, GIST48B (RRID: CVCL_M441; KIT-독립적) 및 GIST882 (RRID: CVCL_7044; 엑손 13 K642E의 KIT 돌연변이를 10% FBS, 2mM L-글루타민, 100mg/ml 페니실린 및 100mg/ml 스트렙토마이신을 함유하는 둘베코 변형 이글 배지에서 배양하였다. KIT 인핸서와 독립적인 KIT 구조(rescue) 세포주는 이전에 설명한대로 생성하였다. 비상업적 세포주는 2014년부터 2016년 사이에 Jonathan Fletcher의 실험실에서 얻었다. KIT 엑손의 서열을 분석하여 GIST 세포주의 예상되는 코딩 돌연변이와 세포 식별(identity)을 확인했으며, 원래 또는 파생된 스톡에서 세포를 해동하여 이를 설명된 실험에서 약 3개월 이내에 사용했다. X-tremeGene (Roche, Cat# 6365809001)을 사용하여 형질감염을 수행했다. 렌티바이러스 생산은 이전에 설명된 대로 수행하였다 (문헌 [Hemminget *al.*, PLoS Biol. 6:e2571-15 (2008)]).

간략하게, 293FT 세포를 pMD2.G (Addgene #12259), psPAX2 (Addgene #12260) 및 렌티바이러스 발현 플라스미드로 공동형질감염시켰다. 바이러스 상층액을 대략 72시간 수집하고 1,000g에서 5분 동안 원심분리하여 잔해물(debris)을 제거했다. 60분 동안 680g에서 스피노클레이션(spinoculation)을 통해 세포에 8 μg/mL의 바이러스 상층액과 폴리브렌을 형질도입했다. 약물은 표시된 농도로 사용되었으며 이마티닙 (LC Laboratories Cat# I-5508), WM-1119 (Selleck Chemicals Cat# S8776), VTP-50469 (Syndax Pharmaceuticals의 기증), 타제메토스타트 (Selleck Chemicals Cat# S7128), 및 EPZ-5676 (Selleck Chemicals Cat# S7062)을 포함했다. 시간 경과에 따른 성장 분석을 위해, 96-웰 플레이트에 웰당 15 x 10³ 세포를 분배하고, 바이러스로 형질도입하거나 약물로 처리하고, 대조군 조건에 대한 세포 수의 정규화와 함께 Guava easyCyte 유세포 분석기 (Luminex Corporation)에서 세포 계수를 대략 주당 2회 수행했다.

[0104] 게놈 규모의 CRISPR 스크린. 18,436 개의 유전자와 185,634 sgRNA를 표적으로 하는 리우 인간 CRISPR 라이브러리 (Addgene #1000000132; 문헌 [Fei *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 116:25186-95 (2019)]) H1 및 H2의 두 개의 풀링 라이브러리로 나뉘지며, 각 라이브러리에는 유전자당 약 5개의 sgRNA가 포함되어 있다. 각 비리온(virion)에는 sgRNA, Cas9 및 렌티CRISPRv2에서 파생된 퓨로마이신 저항성 유전자가 함유되어 있다. 세포주 GIST-T1 및 GIST430을 각 라이브러리와 중복으로 형질도입했다 (*n* 총 8). 각 라이브러리 형질도입에 대해, 44.64 x 10⁶ 세포가 0.3의 목표 MOI에서 형질도입되었으며 추정 라이브러리 적용범위(coverage)는 134x이다. 선별을 위해 72시간에 퓨로마이신을 적용했다. 세포는 대략 30일 동안 라이브러리 적용범위를 >134x로 유지하기 위해 합류점에서 계대 배양하였다. 실험이 종료되면, 라이브러리당 30 x 10⁶ 세포에서 게놈 DNA를 추출했다. 32개의 개별 100 μL 반응 내의 각 실험 복제물의 200 μg의 게놈 DNA로부터 U6과 EF-1 사이의 sgRNA 영역을 증폭했다. 생성물(product)을 풀링하고, 일루미나(Illumina) 어댑터와 6bp 바코드를 통합하기 위해 두 번째 PCR 반응을 수행했다. 전장 앰플리콘을 농축하기 위해 세 번째 PCR 반응을 수행했다 (프라이머는 표 1 내지 표 3에 자세히 설명되어 있음). 최종 앰플리콘 라이브러리는 아가로스 겔 전기영동 및 QIAquick 겔 추출 키트 (Qiagen Cat# 28704)를 사용한 추출에 의해 정제하였다. NovaSeq 6000 (Illumina)에서 차세대 시퀀싱을 수행했다. MAGeCK 소프트웨어 (버전 0.5.8)를 사용하여 스크린 데이터를 분석했다 (문헌 [Wang *et al.*, Nat. Protoc. 14(3):756-780 (2019)]). "카운트(count)" 명령은 기준 대조군으로 사용된 초기 플라스미드 라이브러리 (*n*=2)와 함께 모든 라이브러리(*n*=8)의 리드(read) 카운트를 생성하는 데 사용하였다. 시퀀싱 깊이의 영향을 최소화하기 위해 샘플 간 총 개수를 정규화했다. 최대 우도 추정 명령은 H1 및 H2 라이브러리에 함유된 대조군 AAVS1 sgRNA로 정규화된 데이터와 함께, 각 스크린에 대한 β-점수를 생성하는 데 사용하였다. 메타스케이프 (Metascape)를 유전자 온톨로지 농축 분석에 사용하였다 (문헌 [Zhou *et al.*, Nat. Commun. 10(1):1523 (2019)]).

[0105] 표 3: 대표적인 프라이머의 핵산 서열

| 올리고뉴클레오티드 | 서열 (5'→3') | 적용(application) |
|-------------------|---|-------------------------|
| sgDOT1L_e1_For | CACCGACGTAGACCGGCAGCGCCA (SEQ ID NO: 21) | sgRNA |
| sgDOT1L_e1_Rev | AAACTGGCCGCTGCCGGTCTACGTC (SEQ ID NO: 22) | sgRNA |
| sgDOT1L_e8_For | CACCGCGAATCGCCAACACGAGGTA (SEQ ID NO: 23) | sgRNA |
| sgDOT1L_e8_Rev | AAACTACCTCGTGTGGCGATTTCGC (SEQ ID NO: 24) | sgRNA |
| GAPDH_For | TGCACCACCAACTGCTTAGC (SEQ ID NO: 25) | qPCR |
| GAPDH_Rev | GGCATGGACTGTGGTCATGAG (SEQ ID NO: 26) | qPCR |
| NPR3_For | AGGGTTTGACACGTCATC (SEQ ID NO: 27) | qPCR |
| NPR3_Rev | GTCACTGCTCGCACACATGA (SEQ ID NO: 28) | qPCR |
| DUSP6_For | CTCTACGACGAGAGCAGCAG (SEQ ID NO: 29) | qPCR |
| DUSP6_Rev | AGACACCACAGTTCTTGCCC (SEQ ID NO: 30) | qPCR |
| USP1_For | TCGCACCCACACTCATTCG (SEQ ID NO: 31) | qPCR |
| USP1_Rev | GGGCTACCTCTTGAAAGTCCA (SEQ ID NO: 32) | qPCR |
| CRISPR_1st_For | AATGGACTATCATATGCTTACCGTAACCTGAAAAGTATTTCG (SEQ ID NO: 33) | CRISPR 스크린 1st 라운드 프라이머 |
| CRISPR_1st_R | TCTACTATTCTTCCCTGCACTGTGACTGTGGCGGATGTGCGCTCTG (SEQ ID NO: 34) | CRISPR 스크린 1st 라운드 프라이머 |
| CRISPR_2nd_For_01 | AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCAAGGTCAtcttggaaaggacgaacaccg (SEQ ID NO: 35) | CRISPR 스크린 2nd 라운드 프라이머 |

[0106]

하여 핵 DNA를 염색했다. 분석은 Guava easyCyte 유세포 분석기 (Luminex Corporation)에서 수행되었으며, Guava InCyte 소프트웨어를 사용하여 단일 세포의 핵 함량에 대해 평가했다. 제조업체의 권장사항에 따라, Guava Nexin 시약 (Luminex Corporation Cat# 4500-0450)를 사용하여 약물 처리 72시간 후에 세포자연사와 세포 사멸을 측정했다. 비-세포자연사 세포는 아넥신 V 및 7-AAD에 대해 음성으로 염색되고, 초기 세포자연사 세포는 아넥신 V에 대해 양성으로 염색되지만 7-AAD에 대해서는 음성으로 염색되며, 후기 세포자연사 및 사멸 세포는 아넥신 V 및 7-AAD 모두에 대해 양성으로 염색된다. Guava easyCyte 유세포분석기 상에서 염색을 분석하고 Guava InCyte 소프트웨어를 사용하여 데이터를 분석했다.

[0111] 정량적 RT-PCR. RNeasy 미니 키트 (Qiagen Cat# 74106)를 사용하여 RNA 추출을 위해 세포를 트립신 처리하고 PBS에서 세척했다. SuperScript IV VIL0 cDNA 합성 키트(Invitrogen Cat# 11766050)를 사용하여 cDNA 라이브러리를 만들었다. RT-PCR은 퀀트스튜디오 6 플렉스 실시간 PCR 시스템 (Thermo Fischer Scientific)에서 파워 SYBR 그린 PCR 마스터 믹스 (Life Technologies Cat# 4367659)를 사용하여 수행했다. 상대 mRNA 수준은 GAPDH 발현을 기준으로 사용하여 $\Delta\Delta Ct$ 방법으로 계산하였다. 프라이머는 표 1 내지 표 3에 나열되어 있다.

[0112] RNA-seq. Rneasy 플러스 키트 (Qiagen Cat# 74136)를 사용하여 총 RNA를 분리하고, 나노드롭 (Thermo Fisher Scientific)으로 농도를 측정하고 TapeStation 4200(Agilent)으로 품질(quality)을 측정했다. NEBNext 울트라 II DNA 라이브러리 프랩 키트 (뉴 잉글랜드 바이오랩 Cat# E7645S)를 사용하여 라이브러리 준비를 수행했다. NovaSeq 6000 (일루미나)에서 페어드-엔드(paired-end) 150bp 시퀀싱을 수행했다. RNA-seq 데이터는 STAR (문헌 [Dobin *et al.*, Bioinformatics 29 :15-21 (2012)])를 사용하여 hg19에 정렬하고, 커플링크스(Cufflinks)를 사용한 발현 정량화를 통해 백만 매핑된 리드 당 전사체 킬로베이스 당 단편 (FPKM) 단위의 유전자 발현 값을 생성했다. 분자 시그니처 데이터베이스의 홀마크 유전자 목록을 사용하여, 유전자 세트 농축 분석 (GSEA, RRID:SCR_003199)을 수행했다.

[0113] ChIP-seq 및 Cut&Tag. ChIP-seq의 경우, 대략 20×10^6 세포를 1% 포름알데히드에서 10분 동안 인큐베이션했다. 고정 후, 과량의 포름알데히드를 0.125M의 글리신으로 5분 동안 퀀칭했다. 샘플을 PBS로 세척하고 온전한 핵을 SDS 완충액 (0.5% SDS, 50mM Tris, 100mM NaCl, 5mM EDTA 및 프로테아제 억제제 콕테일 (Roche Cat# 11873580001))에 현탁시키고 E220 Focused-초음파기 (Covaris, Inc.)에서 소니케이션했다. 소니케이션된 샘플을 20,000g으로 회전시켜 정화하고, 상층액을 <0.1% SDS로 희석한 다음, 항체 (H3K9ac, Active Motif Cat# 39137, RRID:AB_2561017; H3K4me3, Abcam Cat# ab8580, RRID:AB_306649; BRPF1, Thermo Fisher Scientific Cat# PA5-27783, RRID:AB_2545259; KAT6A, Cell Signaling Technology Cat# 78462; HA, Cell Signaling Technology Cat# 3724, RRID:AB_1549585; DOT1L, Cell Signaling Technology Cat# 77087, RRID:AB_2799889; H3K79me2, Cell Signaling Technology Cat# 5427, RRID:AB_10693787)와 미리 결합된 다이내미드 단백질 A (Life Technologies Cat# 10002D)와 함께 하룻밤동안 배양했다. 샘플을 용출 버퍼 (200 mM NaCl, 100 mM NaHCO₃, 1% SDS)에 비드를 재현탁하고 65°C에서 12-15 시간동안 인큐베이션하여 가교를 역전시킨 후, 버퍼 A (150mM NaCl, 5mM EDTA, 5% 수크로스, 1% 트리톤 X-100, 0.2% SDS, 20mM Tris), 버퍼 B (5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% 디옥시콜레이트, 20 mM Tris), 버퍼 C (250 mM LiCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP40, 0.5% 디옥시콜레이트, 10 mM 트리스) 및 TE로 연속적으로 세척했다. 제조업체 권장사항에 따라 AMPureXP 비드 (Beckman Coulter Cat# A63881)를 사용하여 DNA를 정제하고, 큐비트 dsDNA HS 분석 키트 (Life Technologies Cat# Q32854) 및 TapeStation 4200(Agilent)을 사용하여 품질을 평가했다. ThruPLEX DNA-seq 키트 (Takara Bio Cat# R400675)를 사용하여 시퀀싱 라이브러리를 준비하고, NextSeq 500 또는 550 시스템 (일루미나)에서 시퀀싱했다. ChIP-seq 스파이크-인 정규화는 다이내미드에 관심 있는 IP 항체와 사전 결합된 스파이크-인 항체 (Active Motif Cat# 61686)를 함께 사용하여 수행했다. 제조업체의 권장 사항에 따라 준비된 GIST 세포 염색질에 노랑초파리 (*Drosophila melanogaster*) 염색질 (Active Motif Cat# 53083)을 동일한 양으로 첨가했다. 결과적으로 시퀀싱된 샘플은 초파리(*Drosophila*) 게놈에 정렬되었으며, 전체 초파리 리드 카운트는 샘플 전체에서 호모 사피엔스 리드 카운트를 정규화하는 데 사용되었다.

[0114] Cut&TAG는 이전에 설명된 대로 단백질 A 및 Tn5 트랜스포사제 융합 단백질 (Addgene #124601)을 사용하여 수행했다 (문헌 [Kaya-Okur *et al.*, Nat. Commun. 10(1):1930 (2019)]). 간단히 말하면, 100,000개의 GIST-T1 세포를 세척 버퍼 (20mM HEPES pH 7.5, 150mM NaCl, 0.5mM 스페르미딘, 프로테아제 억제제 콕테일)로 세척하고, 콘카나발린 A 비드 (Bangs Laboratories Cat# BP531)에 실온에서 15분간 결합하였다. 결합된 세포를 50 μ L Dig 세척 버퍼 (20mM HEPES pH 7.5, 150mM NaCl, 0.5mM 스페르미딘, 프로테아제 억제제 콕테일, 2mM EDTA, 0.05% 디기토닌)에 재현탁하고, 1:100으로 희석된 항체와 함께 4°C에서 밤새 배양했다 (메닌, Bethyl Cat# A300-105A, RRID:AB_2143306; MLL1n, Bethyl Cat# A300-086A, RRID:AB_242510). 자석을 사용하여 비드를 수집하고 세포를

1:100으로 희석된 2차 항체와 함께 100 μ L Dig-세척 버퍼에 재현탁하고 실온에서 30분 동안 인큐베이션했다. 세포를 Dig-세척 버퍼로 3회 세척하고, 1:250 pA-Tn5 트랜스포사제를 함유하는 Dig-Med 버퍼 (0.05% 디기토닌, 20 mM HEPES, pH 7.5, 300 mM NaCl, 0.5 mM 스페르미딘, 프로테아제 억제제 콕테일) 내에 재현탁하고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션했다. 세포를 Dig-Med 버퍼로 3회 세척하고, 300 μ L 태그먼트이션(tagmentation) 버퍼 (Dig-Med 버퍼 내 10mM MgCl₂)에 재현탁시킨 후, 37°C에서 1시간 동안 배양했다. 10 μ L의 0.5M EDTA, 3 μ L의 10% SDS 및 2.5 μ L의 20mg/mL 프로테이나제 K (Invitrogen Cat# 25530049)를 추가하여 태그먼트이션을 중단하고, 샘플을 50°C에서 1시간 동안 인큐베이션했다. 태그먼트된(tagmented) DNA를 페놀:클로로포름:이소아밀 알코올 추출로 정제하고 수성층을 에탄올 침전시킨 후 DNA를 30 μ L TE에 재현탁하였다. 각 샘플에 대해, 21 μ L DNA를 범용 i5 및 고유 바코드 i7 프라이머와 혼합하고, 다음 조건을 사용하여 유전자증폭기(thermocycler)에서 NEBNext High Fidelity 2x PCR 마스터 믹스 (New England Biolabs Cat# M0541S)를 사용하여 증폭했다: 30초 동안 98°C; 98°C에서 10초, 63°C에서 10초의 14 사이클; 72°C에서 2분. DNA는 제조업체 권장 사항에 따라 AMPureXP 비드로 정제되었으며, 품질은 큐비트 dsDNA HS 분석 키트 및 TapeStation 4200으로 평가하였다. 샘플은 NextSeq 550 시스템(Illumina)에서 시퀀싱하였다.

[0115] 모든 시퀀싱 데이터는 Bowtie2를 사용하여 인간 참조 게놈 어셈블리 hg19에 정렬되었다 (문헌 [Langmead *et al.*, *Genome Biol.* 10:R25.1-R25.10 (2009)]). 정규화된 리드 밀도는 Bamliquidator (버전 1.0) 리드 밀도 계산기를 사용하여 계산하였다. 정렬된 리드는 200bp 확장되었으며, 염기쌍 당 리드 밀도를 계산했다. 각 지역에서, 리드 밀도는 총 백만 개의 매핑된 리드의 수로 정규화 되어, bp 당 백만 개의 매핑된 리드(rpm/bp) 당 리드 단위 내 리드 밀도를 생성했다. 피크 찾기(peak finding)은 ChIP-seq(MACS, 버전 1.4.2, [Feng *et al.*, *Nature Protocols* 7 :1728-40 (2012)])에 대한 모델 기반 분석에 의해 수행되었고 ROSE2([Loven *et al.*, *Cell* 153:320-34 (2013)])가 신호 농축 영역을 식별하는데 사용되었다. 개별 ChIP-seq 트랙 디스플레이는 bamplot (bamplot) (github.com/linlabbcm)을 사용하여 생성하였다. ChIP-seq 데이터의 히트 맵 시각화는 ChAsE를 사용하여 생성하였다 (문헌 [Younesy *et al.*, *Bioinformatics* 32 :3324-6 (2016)]).

[0116] 면역 블로팅. 세포를 프로테아제 억제제 콕테일 (Roche Cat# 11873580001)을 함유한 RIPA 버퍼에서 용해시키고, 14,000g에서 10분 동안 원심분리하여 게놈 DNA 및 잔해를 제거했다. 단백질 농도는 비스코닌산-기반 분석 (Pierce Biotechnology Cat# 23225)을 사용하여 결정하였다. 단백질 샘플을 다음 항체를 사용하여 SDS-PAGE 및 웨스턴 블로팅하였다: HA (1:1,000, Cell Signaling Technology Cat# 2367, RRID:AB_10691311), MEAF6 (1:500, Proteintech Cat# 26465-1-AP, RRID:AB_2880524), 액틴 (1:1,000, Cell Signaling Technology Cat# 4967, RRID:AB_330288), 메닌 (1:10,000, Bethyl Cat# A300-105A, RRID:AB_2143306), 또는 스트렙트아비딘-HRP (1:40,000, Abcam Cat# ab7403). 웨스턴 블롯을 항-마우스 또는 항-토끼 2차 항체로 조사하고, Odyssey CLx 적외선 이미징 시스템(LI-COR Biosciences) 또는 화학발광에 의한 스트렙트아비딘-HRP (MilliporeSigma Cat# WBKLS0500)를 사용하여 검출했다. 표시된 면역블롯은 적어도 세 가지 독립적인 실험을 나타낸다.

[0117] 질량 분석법 및 BioID. 대조군 또는 실험적 돌연변이 비오틴 리가아제(BirA* R118G)-태그된 융합 단백질을 안정적으로 발현하는 GIST-T1 세포주를 생성하였다. 24시간 비오틴-표지된 전체 세포 용해물을 스트렙트아비딘-세포파로스 비드 (GE Healthcare Cat# 17-5113-01)를 사용하여 4°C에서 밤새 친화성 폴다운을 실시했다. 비드를 50mM 트리스 내 2% SDS로 3회, BioID 버퍼 (50mM 트리스, 500mM NaCl, 0.4% SDS)으로 2회, 50mM 트리스로 6회 세척하고, 100 μ L의 탄산수소암모늄에 재현탁했다. 샘플을 트립신 분해하고, 역상 정화 단계에서 비드와 염을 제거했다. 추출물을 speed-vac에서 건조시킨 후, 5-10 μ L의 2.5% 아세토니트릴 및 0.1% 포름산에 재구성했다. 나노-크기 역상 HPLC 모세관 컬럼은 2.6 μ m C18 구형 실리카 비드를 화염으로 만든 팁(flame-drawn tip)과 함께 융합 실리카 모세관 (내부 직경 100 μ m x ~30cm 길이)에 패키징하여 만들었다. 컬럼을 평형화한 후, 각 샘플을 과모스 오토 샘플러 (LC Packings)를 통해 로드했다. 구배(gradient)가 형성되었고, 97.5% 아세토니트릴 및 0.1% 포름산의 농도가 증가하면서 펩티드가 용출되었다. 펩티드가 용출되면, 이를 전기분무 이온화한 다음 LTQ Orbitrap Velos Pro 이온 트랩 질량 분석기(Thermo Fisher Scientific)에 넣었다. 펩티드를 검출, 분리 및 단편화하여 각 펩티드에 대한 특정 단편 이온의 탠덤 질량 스펙트럼을 생성했다. 펩티드 서열 (및 그에 따른 단백질 동일성)은 단백질 데이터베이스를 Sequest (Thermo Fisher Scientific)에 의해 획득된 단편화 패턴과 일치시켜 결정했다. 모든 데이터베이스에는 모든 서열의 역방향 버전이 포함되어 있으며, 데이터는 1~2%의 펩티드 오류 발견율로 필터링하였다. 정량적 비교를 위해 반복실험(replicate) 샘플에서 신호 강도의 무표지 정량화를 사용했다. DMSO와 비교하여 신호의 log₂ 배수 변화에 대한 히트 맵은 Morpheus (software.broadinstitute.org/morpheus/)을 사용하여 생성하였다.

[0118] 이종이식 모델. PG27 환자 유래 이종이식은 임상적으로 지시된 수술을 받고, 다나-파버 암 연구소 (Dana-Farber

Cancer Institute) IRB가 승인한 연구 프로토콜에 대한 서면 동의를 받은 환자로부터 얻은 것이다. 냉동 보존된 종양 또는 마트리겔(matrigel)과 1:1로 혼합된 GIST-T1 세포주를 6주령 암컷 누드 마우스 (NU/NU; Charles River Laboratories)에 피하 이식했다. GIST-T1은 마이코플라스마 및 설치류 병원체(Charles River Laboratories)에 대해 음성 판정을 받았다. CRISPR/Cas9 변형 세포주 성장의 생체 내 평가를 위해, GIST-T1/Cas9 세포를 표시된 sgRNA로 처리하고 양측 옆구리 이식 전 14일 동안 시험관 내에서 퓨로마이신으로 선별했다. 약물 치료 연구를 위해, 캘리퍼스로 측정하고 종양 부피 공식: 부피 = 긴 직경² X 짧은 직경 X 0.5에 의해 결정된 종양 크기가 대략 100-200 mm³에 도달하면, 단일 생착된 마우스를 치료 그룹에 등록했다. 마우스를 무작위로 이마티닙 (매일 50mg/kg 위관 영양, 주 5일), WM-1119 (하루 3회 50mg/kg 위관 영양, 주 7일), VTP-50469 (먹이 중 0.1%) 또는 병용 치료를 투여한 치료 그룹으로 배정했다. 이마티닙은 병용 요법의 테스트를 용이하게 하기 위해 최대 내약 용량 미만으로 투여하였다. 표본 크기를 미리 결정하기 위해 통계적 방법을 사용하지 않았으며, 약물 치료 중 사망한 동물은 없었다. 대조군의 두 마리의 GIST-T1 세포주 이종이식 마우스는 초기에 측정된 피하 이식물이 성장하지 못했기 때문에 분석에서 제외하였다. 도 7d의 VTP-50469 군(arm)에서 한 마리의 이상치(outlier) 종양-보유 마우스는 빠른 종양 성장으로 인한 조기 사망으로 인해 제외하였다. 종양을 절개하고 10% 포르말린에 고정하여 절개된 종양의 H&E 염색 및 면역조직화학을 포함한 후속 연구를 수행했다. 고정 및 매립된 종양에서 4 μm 섹션을 절단하고Ki-67 (1:400, Cell Signaling Technology Cat# 9027) 및 절단된 카스파제-3 (1:250, Cell Signaling Technology Cat# 9579)으로 염색했다. 제조업체 권장사항에 따라 DAB (Cell Signaling Technology Cat# 8059) 또는 NovaRed (Vector Laboratories Cat# SK-4800) 기질 키트를 사용하여 반응을 진행했다. 모든 절차는 다나-파버 암 연구소의 기관 동물 관리 및 사용 위원회가 승인한 프로토콜에 따라 수행했다.

[0119] 통계 분석. 중앙값, 오차 막대, P-값 컷오프, 반복실험의 수 및 통계 테스트는 해당 도면의 범례에서 확인할 수 있다. 박스 플롯의 경우, 박스는 25번째부터 75번째 백분위수까지 확장되며, 중앙선은 중앙값을 나타내고, 수염 (whisker)은 10 번째 및 90번째 백분위수에 그려진다. 샘플 크기는 미리 결정되지 않았다.

[0120] 데이터 및 자료 이용가능성. 새로운 시퀀싱 데이터는 GEO 출판물 참조 ID GSE172154를 통해 이용 가능하다. 본 연구에서 분석된 추가 RNA-seq, ATAC-seq 및 ChIP-seq 데이터 세트에는 GSE95864, GSE113207 및 GSE113217가 포함된다 (문헌 [Hemming *et al.*, *Cancer Res.*79(5):994-1009 (2019)]).

[0121] 실시예 2: 게놈 전체 스크리닝을 통해 GIST 후성유전학적 의존성을 확인한다.

[0122] GIST의 전반적인 전사 및 인핸서 환경을 RNA-seq, 시퀀싱을 이용한 염색질 면역침전(ChIP-seq), 시퀀싱을 이용한 전이효소-접근 염색질 분석 (assay for transposase-accessible chromatin using sequencing: ATAC-seq)을 사용하여 특성화했다. 이러한 조사는 GIST 샘플에 존재하는 ETV1, FOXF1, HIC1 및 OSR1과 같은 핵심 TF와 질병-상태 특정 패턴으로 발견되는 보조 TF인 BARX1 및 HAND1을 포함하여, GIST 생물학과 관련된 TF에 중점을 두었다 (문헌 [Hemming *et al.*, *Cancer Res.*79(5):994-1009 (2019)]). 그러나, 이러한 TF가 다른 후성유전학적 조절자와 어떻게 통합되어 GIST 연관 유전자 발현 프로그램을 확립하는지는 알려지지 않았다. GIST 생물학에 필수적인 유전자를 확립하기 위해 두 개의 *KIT* 돌연변이 GIST 세포주인 GIST-T1 및 GIST430에서 게놈 전체 CRISPR/Cas9-기반 드롭아웃 스크린을 수행했다. 쌍을 이루는 인간 전체 게놈 sgRNA 라이브러리(H1 및 H2로 표시)를 활용한 분할 라이브러리 접근법이 사용되었으며, 스크린에는 총 185,634개의 sgRNA가 포함된 18,436개의 유전자를 표적으로 하는 각 라이브러리의 유전자당 대략 5개의 sgRNA가 사용되었다. 의존성(β) 점수의 유의미한 상관관계는 도 1a에 도시된 바와 같이 H1 및 H2 라이브러리 사이와 도 1b에 도시된 바와 같이 두 GIST 세포주 사이에서 관찰되었다 (세포주 당, n=4 라이브러리). 그런 다음 후속 분석을 위해 데이터 세트를 병합하여 통계적 검정력을 향상했다 (라이브러리당 n=4). 피어슨 상관관계는 도 1a 및 도 1b에서 P 값과 r^2 를 사용하여 수행했다. 유전자는 이전에 세포 생존에 보편적으로 필수적인 것으로 확인된 '범-필수', 스크린에서 FDR <0.05 이지만 범-필수 목록에는 없는 'GIST 필수', 또는 '비필수'로 계층화하였으며, 도 1c에서, 범-필수 유전자는 파란색, GIST에서 유의미하게 고갈되었지만 범-필수는 아닌 유전자는 빨간색으로, 유의미한 고갈이 결여된 비필수 유전자는 회색으로 표시되어 있다. 선택된 GIST 연관 유전자가 표시되어 있다.

[0123] 예상대로, 도 1d (라이브러리당 n=2)에서 볼 수 있듯이, *KIT*는 가장 강력하게 검출된 종속성 중 하나였으며, sgRNA 수준 데이터는 스크린 동안 대부분의(9/10) sgRNA가 거의 완전히 드롭아웃(dropout)한 것으로 나타났다. 도 1e (n=4)와 같이, mTOR과 같은 KIT 경로의 다른 표준 하류(downstream) 신호 전달 매개체는 스크린에서 유의미한 드롭아웃을 보였지만 KIT에 비해서는 덜한 것으로 나타났다. 범-필수 (n=1,702) 및 비-범-필수 (n=16,757) 중 'GIST 필수' 유전자 서브세트를 집중적으로 분석하여 도 1f에 예시된 바와 같이, GIST에서 특이

적으로 농축될 수 있는 생물학적 과정을 확인했다. 도 1d, 1e 및 1f의 조건은 t-테스트로 비교했다 (비-필수 유전자 또는 기준 sgRNA와 비교; **, P<0.01; ***, P<0.001). GIST에서의 이러한 독특한 종속성은 유전자 온톨로지 농축 분석에 의해 평가되었으며, 이는 상위 18개 용어(term) 중 8개가 염색질 및 염색체 구성을 포함하는 후생학적 조절 메커니즘과 연관되어 있음을 밝혀냈다 (도 1g 및 8a 참조). 종합해 보면, 이러한 편향되지 않은 종속성 스크린의 데이터는 GIST가 발암 프로그램을 유지하기 위해 후생유전학적 메커니즘에 크게 의존하고 있다는 것을 특징으로 한다 (문헌 [Tabone *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta.* 1741(1-2):165-72 (2005)]).

[0124]

어떤 염색질 조절 복합체가 GIST 생물학과 가장 관련성이 있고 고유할 수 있는지 더 잘 정의내기 위해, GIST 세포주의 모든 염색질 변형 효소에 대한 β -점수를 DepMap 프로젝트의 모든 세포주에서 평균화한 유사한 (analogous) CERES 종속성 점수와 비교했다. 평가된 염색질 변형 효소 77개 중 7개만이 GIST에 고유하고 필수적이었으며, β -점수 <-0.7, CERES 점수>-0.25로 (도 2a 및 도 8n), 종속성 점수 컷오프는 피어슨 상관관계수에 대한 고유한 종속성 및 표지일 가능성이 높은 염색질 조절 인자를 선택하기 위해 선택되었다. 농축된 효소에는 라이신 아세틸트랜스퍼라제(KAT), MYST, 라이신 데메틸라제 (KDM) 및 라이신 메틸트랜스퍼라제(KMT) 계열의 구성원이 포함되었다. 점선은 플롯을 사분면으로 나누고, 위쪽 사분면에는 GIST에 종속되었지만 DepMap 세포주 전체에 걸쳐 공통 종속성은 아닌 7개의 유전자가 포함되어 있다. 어떤 변형 효소가 후생유전체를 유지하기 위해 협력적으로 기능할 수 있는지 확인하기 위해, DepMap 내에서 유전자 수준의 상호-종속성 데이터를 분석했다. 각 염색질 변형 효소의 상위 50개 상호-종속성을 비교 분석한 결과, 도 2b에 도시된 바와 같이 KMT2A, EZH2 및 KAT6A가 유전자 및 온톨로지 용어 수준에서 가장 높은 상호작용을 보여, 이들의 유전적 상호-종속성을 시사한다. 도 2b에서, 빨간색 선은 여러 상호-종속성 목록에서 공유되는 유전자를 연결한다. 파란색 선은 동일한 온톨로지 용어에 속하는 유전자를 연결한다. 메닌-MLL 복합체의 촉매 구성원인 KMT2A는, 도 8b에서 볼 수 있듯이, MEN1/메닌 및 ASH2L을 포함하여 상당한 종속성 점수를 갖는 다수의 인식된 복합체 구성원을 가지고 있다. DepMap CRISPR 종속성 스크리닝에서 GIST를 프로파일링한 사례가 없기 때문에, RNAi로 프로파일링한 약 400개의 세포주 중 GIST-T1을 포함한 프로젝트 드라이브(Project DRIVE)의 비교 스크리닝 결과를 활용했다. 프로파일링된 모든 세포주 중에서, 도 2c 내지 2f에서 볼 수 있듯이, KMT2A 및 ASH2L은 GIST-T1에 대한 민감도가 상위 5%에 속했으며, 독립적이고 비교적인 스크리닝 접근법을 통해 GIST에서 MOZ와 메닌-MLL 복합체의 필수적이고 상호 의존적인 특성을 추가로 보여주었다. 여러 다른 염색질 조절 복합체는 스크린에서 유의미한 종속성을 갖는 다수의 구성원이 있는 것으로 밝혀졌으며, 도 8c 내지 8m과 같이, INO80 복합체, NuA4 히스톤 아세틸트랜스퍼라제 복합체, FACT 복합체 및 PAF1 복합체의 구성원을 포함하여 프로젝트 드라이브에서 GIST-T1에 대한 농축도 보여주었다. 도 8i 내지 8j는 프로젝트 드라이브 세포주 (n=387)의 FACT 복합체 구성원에 대한 순위 민감도 점수를 보여주며, GIST-T1은 빨간색으로 강조 표시되어 있다. 도 8l 내지 8m은 프로젝트 드라이브 세포주 (n=387)의 PAF1 복합체의 선택된 구성원에 대한 순위 민감도 점수를 보여주며, GIST-T1은 빨간색으로 강조 표시되어 있다. PRC2 복합체의 핵심 구성원인 EZH2, SUZ12 및 EED (문헌 [Laugesen *et al.*, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6(9):a026575 (2016)])는 모두 스크린에서 종속성을 보였으며, 도 9a 내지 9c에서와 같이, 프로젝트 드라이브에서 GIST-T1은 EZH2 및 EED에 대한 민감도 점수가 가장 높았다. 도 9b 및 9c는 프로젝트 드라이브 세포주 (n=387)의 PRC2 복합체의 선택된 구성원에 대한 순위 민감도 점수를 보여주며, GIST-T1은 빨간색으로 강조 표시되어 있다. DepMap에서 핵심 PRC2 복합체 구성원에 대한 유의미한 종속성을 갖는 세포주는 거의 없었지만, 도 9e에서 볼 수 있듯이, DOT1L, EP300 및 MEN1을 포함한 EZH2의 상위 상관관계 상호-종속성은 MOZ 및 메닌-MLL 복합체 상호-종속성과 중첩되는 것으로 나타나, 전사 억제성 PRC2 복합체의 상보적 기능을 나타냈다.

[0125]

메닌-MLL 복합체 구성원에 대한 종속성을 검증하기 위해, 메닌-MLL 복합체 구성원인 *KMT2A* 및 *MEN1*을 표적으로 하는 고유 sgRNA를 활용한 시간 경과에 따른 성장 분석을 수행했다. 각각의 유전자에 대해, 그리고 유전자당 2개의 독립적인 sgRNA를 사용하여, 도 2e에서와 같이, sgRNA 처리는 세포 증식을 유의미하게 감소시켰으며, Luc 및 RPS19를 표적으로 하는 sgRNA는 각각 열린 박스 및 원으로 표시된다 (sgRNA당 n=3). GIST48B는 이러한 sgRNA의 상대적 독성을 대조군 세포주와 비교하는 데 사용되었으며, GIST48B는 GIST-T1과 유사한 성장률을 보였지만, 시험관 내 선택을 통해 KIT 발현 및 GIST 연관 후생유전학적 및 전사 프로그램이 손실되었다. 메닌-MLL 복합체를 표적으로 하는 모든 sgRNA는 GIST-T1 세포 증식을 유의미하게 감소시키는 반면, 도 2f에서 보듯이, GIST48B는 세포 증식에 거의 또는 전혀 변화가 없는 것으로 나타났고, 여기서 두 개의 sgRNA의 유전자 당 n=6이다. 데이터는 동일한 처리 조건에서 GIST48B와 비교한 Tukey의 다중 비교 테스트(Tukey's multiple comparisons test)를 사용한 이원 분산 분석 (two-way ANOVA)로 분석했다: ***, P<0.001; **, P<0.01. 종합해 보면, 이 데이터는 GIST 및 DepMap의 선택된 세포주에서, GIST 후생유전체 유지에 있어 메닌-MLL 복합체에 대한 종속성이 있음을 보여준다.

[0126] 히스톤 마크 H3K4me3, BRPF1 및 KATA6에 대한 ChIP-seq는 GIST 게놈에서 메닌-MLL 복합체가 히스톤과 결합하고 아세틸화하는 위치를 정의하기 위해 수행했다. 메닌과 MLL1의 결합 게놈 영역은 유사한 방법인 CUT&Tag를 사용하여 확인되었다 (문헌 [Kaya-Okur *et al.*, Nat. Commun. 10(1):1930 (2019)]). 메닌-MLL 복합체 구성원은 H3K27ac 및 H3K9ac와의 공동-점유에 따라, 활성 유전자의 전사 시작 서열(TSS)에 위치하는 것으로 관찰되었다 (도 3a 위쪽 행 참조). 대조적으로, H3K27ac-정의된 인헨서에서는 이러한 염색질 복합체 구성원의 점유가 거의 관찰되지 않았다 (도 3a 중간 행 참조). TSS와 인헨서 모두에서 접근 가능한 DNA 부위를 포함하는 ATAC 피크는 중간 수준의 메닌-MLL 복합체 결합을 보여주었다 (도 3a 아래쪽 행 참조). 도 3a에서 TSS의 리드 밀도를 ± 10 kb로 조정된 결과, H3K27ac-정의된 슈퍼 인헨서 또는 ATAC-정의된 피크가 행에 표시되어 있다.

[0127] 다음으로 ChIP-seq 및 CUT&Tag 데이터 세트에서 메닌에 대한 강력한 농축을 보이는 게놈 영역을 분석하여, 이러한 인자가 메닌-MLL 복합체를 대표한다고 추론했다. 이 단백질은 게놈 전체에 걸쳐 수천 개의 부위에 결합하지만, 도 3e 및 10a에서 볼 수 있듯이, 이들 게놈 영역의 3-5%에서 불균형한 농축이 관찰되었으며, 이들 중 다수는 GIST와 명확한 관련성을 갖는다. TF 유전자와 연관된 모든 농축 영역의 백분율 및 상위 사분위수에 대한 백분율이 도 3e 및 3f에 표시되어 있다. 전사인자 부위(TF), 특히 핵심 및 보조 GIST TF 그룹 중 전사인자 부위 (문헌 [Hemming *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 115(25):E5746-E5755 (2018), Hemming *et al.*, Cancer Res. 79(5):994-1009 (2019)])가 이러한 농축 영역에 포함되었으며, DUSP 및 스프라우티 계열(sprouty family) 및 GIST의 바이오마커 (예를 들어, GPR20, CD34 (Corless *et al.*, J. Clin. Oncol. 22(18):3813-25 (2004))로 사용되는 유전자의 KIT 신호전달의 음성 조절자도 마찬가지이다. ChIP-seq 및 CUT&Tag 트랙은 도 3f 내지 3h 및 도 10b에 도시된 바와 같이, 핵심 TF 구성원인 *DUSP6* 및 필수 유전자 *USP1*와 같이, H3K4me3과 유사한 이러한 농축된 유전자의 유전자 본체(body) 및 TSS에서의 메닌-MLL 복합체 구성원의 결합을 보여주는 반면; 대조적으로, H3K27ac 및 H3K9ac는 인헨서 영역과 유전자 본체 모두에서 농축되어 있으며, GIST 보조 TF HAND1은 인헨서에만 결합한다. 이러한 조절 인자가 TSS 및 유전자 본체의 하류 영역에 결합한다는 증거가 있었지만, 메닌-MLL 복합체 구성원은 *KIT* 유전자좌에서 현저하게 농축되어 있진 않았다 (도 10c 참조). 농축된 다른 영역의 TSS 내 및 바로 하류에 있는 메닌-MLL 복합체 구성원의 최대 결합이 관찰되었으며, 이러한 고도로 조절된 유전자의 일부 인헨서에서 검출가능한 신호가 분명하게 나타났다 (도 10d 내지 10h 참조). 이러한 데이터는 메닌-MLL 복합체가 활성 유전자에 전반적으로 존재하며, GIST 전사 프로그램과 관련된 유전자 서브세트에서 농축되어 있다는 것을 나타낸다.

[0128] 실시예 3: 메닌 억제제는 세포자연사 없이 GIST 세포 증식을 방해한다.

[0129] 메닌-MLL 복합체의 유전적 데이터와 게놈 공동국소화(colocalization)를 기반으로, GIST-연결 복합체를 표적으로 하는 소분자 억제제가 실행 가능한 치료 접근법이 될 수 있다고 추론했다. 메닌-MLL 파괴의 기능적 결과를 조사하기 위해 GIST-T1 세포를 메닌 억제제 VTP-50469 (Krivtsov *et al.*, Cancer Cell 36 :660-673 (2019))로 단독으로 또는 선택된 KAT6A 억제제 WM-1119 (Baell *et al.*, Nature 560(7717):253-257 (2018))와 병용 처리했다. 도 4a 및 4b에서 볼 수 있듯이, 마이크로몰 이하 (sub-micromolar) 농도에서, VTP-50469는 시간 경과에 따른 성장 분석에서 GIST 세포 증식을 감소시켰으며, 두 약물을 병용할 경우 더 큰 효과가 나타났다 (도 4b). KIT-의존성 GIST 세포주에서 이러한 억제제의 선택적 독성을 입증한 KIT-독립적 GIST48B 세포주는, 21일 약물 처리 후 증식에 약간의 변화가 있거나 전혀 변화하지 않았으며 (도 4c), 이는 CRISPR 실험의 유전자 데이터와 일치한다 (도 2i). *KIT* 인헨서에 대한 이전 연구에서는 *KIT* TSS로 지시된 sgRNA를 사용하여 내인성 *KIT* 발현을 제거하는 동시에, 동일한 활성화 돌연변이가 있는 바이러스 프로모터 구동 *KIT* 작제물을 발현하여 세포 생존력을 구제(rescue)시켰다 (문헌 [Hemming *et al.*, Cancer Res. 79(5):994-1009 (2019)]). 도 4c에서 볼 수 있듯이, 이 KIT-의존성 *KIT* 구제 세포주는 VTP-50469 단독 또는 WM-1119와의 병용 사용에 대해 유사하게 민감하며, 이는 내인성 *KIT* 유전자좌의 조절이 이들 화합물의 주요 독성 메커니즘이 아님을 나타낸다. 도 4c에는 동일한 처리 하에서의 GIST48B를 기준으로 한 통계적 비교가 나타나있다. 추가적인 GIST 세포주에서 이러한 억제제의 증식 효과를 확인하기 위해, 느리게 성장하는 *KIT* 돌연변이 세포주인 GIST430 (Hemming *et al.*, Cancer Res. 79(5):994-1009 (2019)) 및 GIST882를 VTP-50469 단독 또는 WM-1119와의 병용으로 처리한 결과, 도 4d 및 11a에 나타난 것처럼 약물 치료로부터 발생하는 유사한 항증식 효과가 관찰되었다. 도 11의 데이터는 Dunnett의 다중 비교 테스트를 사용한 일원 분산 분석(one-way ANOVA)으로 분석했다; DMSO 대조군과 비교 ***, P<0.001; **, P<0.01; *, P<0.05.

[0130] VTP-50469 처리의 세포 표현형 결과를 평가하기 위해, VTP-50469와 TKI 이마티닙을 비교 대상으로 사용하여 세포주기 및 세포자연사 분석을 수행했다. 이마티닙은 72시간 이내에 G0/G1 세포 주기 정지(arrest)를 즉각적이고 강력하게 유발한 반면, 도 4e에서 볼 수 있듯이, VTP-50469로 8일간 처리한 결과, G0/G1의 세포 분획이 완만

하게 증가했으며; VTP-50469와 WM-1119를 병용한 경우, 8일 처리 후 세포 주기의 더욱 현저한 파괴를 일으켰다 (도 4e). 72시간 이마티닙 처리는 초기 및 후기 단계의 세포자연사 및 세포 사멸의 유의미한 증가를 가져온 반면, 도 4f (조건 당 n=3 내지 5)에서 볼 수 있듯이, 8일간 VTP-50469를 단독 또는 WM-1119와 병용으로 처리한 경우 DMSO 대조군에 비해 세포자연사나 세포 사멸을 유의미하게 증가시키지 않았다. 데이터는 DMSO 또는 표시된 조건과 비교하여 Tukey의 사후 테스트(Tukey's post-hoc test)를 사용하여, 적절한 경우, 이원 분산 분석 또는 일원 분산 분석으로 분석했다; ***, P<0.001; **, P<0.01. 종합하면, 이러한 데이터는 메닌-MLL 복합체가 표적화 가능하고 GIST에서 고유한 취약성(vulnerability)을 나타내며, 활성 유전자의 게놈 전체에서 TSS에 분포하는 것을 볼 때 단순히 KIT 유전자 발현 이상의 유전자 조절에 필수적인 역할을 한다는 것을 보여준다. 이 복합체의 파괴는 단독으로 또는 MOZ 복합체의 파괴와 결합하여 세포 주기에 변화를 일으키지만 세포예정사(programmed cell death)에서는 변화가 발생하지 않는다.

[0131] 실시예 4: 메닌-MLL 억제제는 전반적인 유전자 발현 변화를 유발한다.

[0132] 메닌-MLL 복합체의 게놈 전체 점유와 선택된 농축 영역을 확인한 다음, 표적 파괴로 인해 발생하는 성장 억제 표현형을 더 자세히 알아보기 위해 VTP-50469, WM-1119 및 VTP-50469와 WM-1119 병용 처리로 인한 유전자 발현의 선택적인 변화를 조사했다 (도 5a, 피어슨 상관관계가 표시됨). VTP-50469 또는 WM-1119로 1일 및 5일 동안 처리한 GIST-T1 세포에 대한 RNA-seq를 수행하여 대조군인 DMSO 처리와 비교했다. VTP-50469 및 WM-1119 처리는 수많은 유전자의 발현을 약간 변경시켰으며 (FPKM>10의 n=5,095), 이들 억제제 간 유전자 발현 변화의 유의미한 상관관계를 보였으며, VTP-50469 및 병용 그룹은 대조군과 가장 큰 편차를 보였다 (도 5a 및 도 5i). 도 5i는 모든 발현 유전자 (>10 백만 매핑 리드 당 전사체의 킬로베이스 당 단편(FPKM), n=7,106)에 대해 5일간 GIST-T1을 VTP-50469로 0.5 μmol/L, WM-1119로 1 μmol/L, 또는 각 약물을 0.1 μmol/L로 병용 처리한 경우 (조건 당 n=4)를 비교한 RNA-seq 데이터의 비감독형 계층적 클러스터링을 나타낸 것이다.

[0133] 각각 두 개의 복합체 구성원을 표적으로 하는 sgRNA를 사용하여 MOZ 및 메닌-MLL 복합체의 유전적 파괴에 따른 유전자 발현 변화도 평가했다. 이 유전 시스템을 사용하여, MEN1을 표적으로 하는 sgRNA는 유전자 발현의 전반적인 변화를 가져왔으며, 다른 MOZ 및 메닌-MLL1 복합체 구성원의 파괴는 덜 극적인 변화를 보였고 (도 5j), 이는 KAT6A, BRPF1, KMT2A, MEN1, 또는 루시퍼라제를 표적으로 하는 sgRNA를 대조군으로 하여 GIST-T1/Cas 9 세포 (조건당 n=3)를 전사하고 5일차에 수집한 RNA-seq 데이터의 비감독형 계층적 클러스터링을 보여준다.

[0134] 약리학적 또는 유전적 파괴로 인해 발생하는 전사 변화를 통합하고 비교하기 위해, 전사체 전반에서 대조군과의 유전자 발현 변화의 상관관계를 평가했다. 비교를 위해, GIST TF HAND1 및 ETV1의 sgRNA-매개 파괴로 인한 전사 변화도 평가하였다. MOZ 복합체 구성원인 KAT6A 및 BRPF1을 표적으로 하는 sgRNA는 가장 높은 수준의 상관관계를 나타냈으며, 더욱이 HAND1, ETV1 또는 KMT2A의 파괴와 마찬가지로 유사한 전반적인 전사 변화를 유도했다 (도 5k 내지 5s). MOZ 및/또는 메닌-MLL 복합체의 약리학적 억제는 GIST TF, MOZ 복합체 구성원 및 KMT2A를 표적으로 하는 sgRNA와 비교적 약하지만 양의 상관관계를 보인 반면, MEN1의 유전적 파괴는 다른 조건과 가장 낮은 상관관계를 보였다 (도 5k 및 5n). 도 5k는 도 5i 및 도 5j의 대조군-정규화된 RNA-seq 데이터와 HAND1 및 ETV1을 표적으로 하는 sgRNA로 형질도입된 GIST-T1/Cas9 세포의 대조군-정규화된 RNA-seq 데이터의 피어슨 상관관계를 보여준다. 이 데이터는 이러한 후성유전학적 조절자의 유전적 또는 화학적 파괴로 인해 발생하는 서로 다른 전역적 전사 결과를 보여준다.

[0135] 유전자 세트 농축 분석(GSEA)을 사용하여 MOZ 및 메닌-MLL 복합체, H3K27ac-정의된 슈퍼 인헨서(SE)-연관 유전자, 및 TF HAND1 및 ETV1에 의해 조절되는 유전자가 농축된 유전자의 발현을 평가했다. 이러한 GIST 연관 유전자 목록 중 TF에 의해 조절되는 유전자가 가장 현저하게 영향을 받았으며, 약물 또는 sgRNA 처리로 인해 HAND1에 의해 상향 조절되는 유전자의 발현을 감소시키고, 일반적으로 HAND1 또는 ETV1 기능에 의해 하향 조절되는 유전자의 발현이 증가했고 (도 5o), 이는 메닌 및 BRPF1에 대한 농축을 나타내는 유전자 (n=385), H3K27ac에 의해 정의된 GIST-T1 SE 연관 유전자 (n=366), HAND1에 의해 상향 조절된 유전자 (n=421) 또는 하향 조절된 유전자(n=165), 및 ETV1에 의해 상향 조절된 유전자 (n=438) 또는 하향 조절된 유전자 (n=31)을 포함하는 GSEA 유전자 세트의 정규화된 농축 점수(NES)를 보여준다.

[0136] 유의미한 FDR을 가진 유전자 세트만 색상 눈금을 사용하여 표시되며, 유의미하지 않은 FDR을 갖는 유전자 세트는 회색으로 표시된다. 유전적 또는 약리학적 MOZ 파괴는 메닌 또는 BRPF1이 결합된 유전자에 가장 큰 영향을 미친 반면 (도 5h), HAND1만을 표적으로 하거나 WM-1119와 VTP-50469의 병용은 SE 연관 유전자의 발현을 감소시켰다 (도 5q). 그러나, 모든 조건에서 공통적으로, 억제제 또는 직접 HAND1 녹아웃을 표현형모사(phenocopying)하는 sgRNA를 사용한 MOZ 및 메닌-MLL 복합체의 발현 값과 함께, HAND1 연관 유전자 발현이 중단되었다 (도

5r 내지 5t).

- [0137] KIT 유전자 발현은 메닌의 약리학적 또는 유전적 파괴에 의해 가장 현저하게 영향을 받은 반면, KIT 신호전달의 음성 조절자인 DUSP6와 GIST 바이오마커 CD34의 공통적인 손실이 있었다 (도 5u). 몇몇 핵심 GIST TF의 발현은 유전적 또는 약리학적 MOZ 또는 메닌-MLL 복합체 파괴 - 특히, FOXF1, HAND2 및 PITX1-에 의해 변경되었으며, WM-1119는 TF 발현의 전역적 감소를 가장 크게 나타냈다 (도 5v, 도 16a 내지 16b). NPR3, ITGA4 및 RASL11A를 포함하여 HAND1 발현에 의해 고도로 조절되는 여러 다른 유전자들도, MOZ 및 메닌-MLL 복합체의 파괴와 유사한 발현 손실을 보였다 (도 5w). qRT-PCR을 통해 KIT 의존성 GIST 세포주 GIST430, GIST882 및 GIST48에서 DUSP6 및 NPR3의 유전자 발현이 비슷한 수준으로 감소한 것으로 나타났다 (도 16c 내지 도 16f).
- [0138] 모든 리액토(Reactome) 유전자 세트 중에서, 단백질 번역과 관련된 프로세스는 처리 조건 중 가장 반복적으로 변경된 유전자 세트였으며, 대부분의 약물 및 sgRNA 데이터 세트에서 유전자 발현이 감소한 것으로 나타났다 (도 16g 내지 16h). 종합하면, 이러한 결과는 MOZ 및 메닌-MLL 복합체 파괴의 유전적 및 약리학적 수단 모두 GIST TF와 연관된 전사 프로그램의 선택적 변경으로 이어진다는 것을 보여준다. 그리고 가장 주목할만한 것은 HAND1이다. 또한, 저분자를 이용한 메닌과 MOZ의 이중 억제제는 전체 유전자 발현에 대한 상호보완적인 효과를 유도하고, GIST SE 연관 유전자의 발현을 감소시킨다.
- [0139] GSEA는 약물 처리와 연관된 경로 변경(pathway alteration)을 탐색하는데 사용되었다. VTP-50469 처리는 근육 형성 및 상피 중간엽 전이(EMT)와 연관된 유전자 세트의 상당한 상향 조절과 함께, 홀마크 유전자 세트에 유사한 변화를 가져왔다; 약물 처리는 또한 도 5b 및 5c에서 볼 수 있듯이, 세포 주기 및 유사 분열 신호 전달과 연관된 유전자 세트의 발현 감소로 이어졌으며, MTORC1 신호 전달, G2M 체크포인트, 근육 형성 및 EMT 유전자 세트가 각 조건에 대해 도면 상에 표시되어있다. 약물 처리에 따른 유전자 발현의 전체 평균 변화는 미미한 반면, GIST 관련 유전자 세트에서는 유의미한 변화를 보였다. GIST에 필수적인 것으로 확인된 유전자 (도 1c 및 12a 참조) 및 이마티닙 치료 6시간 후 하향 조절된 유전자 (Hemminget *al.*, Cancer Res. 79(5):994-1009 (2019))은 도 5d에 표시된 것처럼, VTP-50469 처리로 인해 발생하는 발현의 상응하는 감소를 보여주었으며, 홀마크 EMT 시그니처는 비교대상으로서 상향조절을 나타내었다 (모든 발현 유전자 n=5,093, 필수 유전자 n=1,507, 이마티닙 6시간 치료로 >2.5-배수로 하향조절된 유전자 n=544, 및 홀마크 EMT 유전자 n=63). 데이터는 DMSO와 비교하여 Dunnett의 다중 비교 테스트를 사용한 일원 분산 분석으로 분석했다; ***, P<0.001; **, P<0.01; *, P<0.05. 도 12a는 억제제 처리 5일 후 상위 500개 필수 유전자에 대한 억제제와 DMSO 처리 간의 발현 비율과 피어슨 상관관계를 보여준다. 메닌이 불균형적으로 더 많이 로딩된 유전자 (n=294)는 도 5e에 도시된 바와 같이, 억제제 처리 후 1일 및 5일 모두에서 유전자 발현이 더 크게 감소했다 (농축이 결여된 유전자, n=4,799와 비교). 도 12b 및 12c에서 볼 수 있듯이, GIST에서 고도로 발현되는 DUSP 및 스프라우티 계열 구성원 중, DUSP6이 가장 크게 감소한 반면, KIT 발현은 VTP-50469에 의해 그 발현이 5일까지 감소하는 경향을 보였다. 이러한 감소는 도 5g 내지 5h에 표시된 바와 같이, qRT-PCR을 사용하여 VTP-50469 단독 또는 WM-1119와 병용 처리한 GIST-T1 및 GIST430의 선택된 전사체 DUSP6, NPR3 및 USP1에서 확인되었으며, 병용 처리는 특히 이들 표적의 유전자 발현에 대해 강력한 추가 효과를 나타내지 않았다. 도 5g 내지 5h, 및 12b 내지 12c의 경우, 그룹당 n=3 내지 4이고, 데이터는 DMSO와 비교하여 Dunnett의 다중 비교 테스트를 사용한 일원 분산 분석으로 분석했다; ***, P<0.001; **, P<0.01; *, P<0.05. 염색질 연구와 함께, 이러한 데이터는 약리학적 메닌 억제, 단독 또는 MOZ 억제와의 병용과 연관된 유전자 발현의 경로-선택적 변화를 강조하며, 세포 주기, 생존력, 영양 KIT 신호 전달과 연관된 유전자의 변화를 식별하고, 중간엽 발달 프로그램을 활성화하여 분화 상태를 잠재적으로 변경한다.
- [0140] 실시예 5: 메닌 억제를 통한 염색질 및 전사 조절 단백질 상호작용의 파괴(disruption).
- [0141] MOZ 및 메닌-MLL 복합체는 다른 염색질 조절자와 함께 고도로 조절된 게놈 영역에서 조정된 방식으로 기능하므로, VTP-50469 단독 또는 WM-1119와 병용의 유무에 따른 국소 단백질 상호 작용에 대한 영향을 평가했다. BioID 시스템 (Lambert *et al.*, J. Proteomics 118 :81-94 (2015))을 사용하여 비오틴 리가아제 BirA*를 MOZ 복합체 구성원 MEAF6의 N-말단에 부착하여, 비오틴 모이어티로 10nm 내에 국소화된 단백질의 공유 표지화를 가능하게 했다. BirA*-태그된 MEAF6가 MOZ 복합체에 포함되는 경우 적절한 통합을 위해, CRISPR/Cas9 및 MEAF6 표적화 sgRNA를 사용하여 내인성 MEAF6를 파괴하였는데, 이는 안정적으로 발현된 MEAF6-BirA* 자체물로 기능적으로 대체되지 않으면 치명적일 수 있다 (도 2e). GIST-T1에서 N-말단 태그된 MEAF6-BirA*의 안정적인 발현은 높은 수준의 단백질 생산으로 이어졌으며, MEAF6 및 HA를 포함한 웨스턴 블롯에서 N-말단 분해 생성물이 관찰되었는데, 이는 내인성 및 전장 구제 자체물 또는 로딩 대조군인 액틴을 나타낸다 (도 6a). 핵 국소화 신호를 유지하는, IKZF1의 DNA 결합 도메인에 BirA*를 융합한 자체물을 핵 백그라운드(background) BioID 대조군으로 사용했다.

비오틴으로 24시간 동안 세포를 표지한 후, 스트렙타비딘 폴다운과 질량 분석을 수행하여 MEAF6-BirA로 표지되고 대조군보다 농축된 243개의 단백질을 확인했다 (도 6b, 표 4). 도 6b에서 파란색으로 표시된 MEAF6-농축된 단백질은 백그라운드 대조군(n=243)에 비해 2배 이상의 농축 강도를 보여주었다. 선택된 상호작용자 (interactor)는 표지 되었다. 표지된 상호작용자에는 MOZ 복합체 구성원, BRD4와 같은 인헨서-연관 단백질 및 핵심 GIST TF HIC1 외에도 KMT2A/MLL1, KMT2B/MLL2, JADE3 및 RUVBL1과 같은 염색질 조절 단백질이 포함되었다. 유전자 온톨로지에 따라 이러한 MOZ-근위 단백질을 정렬한 결과, DNA 복구, mRNA 프로세싱 및 염색질 복합체 조절을 포함한 세포 프로세스의 농축이 관찰되었다 (도 6c). 이러한 데이터는 이러한 전사 조절 단백질의 통합된 세포 기능과 스플라이싱 인자, 인헨서 및 염색질 복합체 간의 복잡한 상호 작용을 보여준다.

[0142] 표 4

| 레퍼런스 | 유전자 기호 | 레퍼런스 | 유전자 기호 | 레퍼런스 | 유전자 기호 |
|-----------------------|-----------|-----------------------|-----------|------------------------|-----------|
| sp Q9HAF1 EAF6_HUMAN | MEAF6 | sp Q9UKV3 ACINU_HUMAN | ACIN1 | sp Q96Q89 KI20B_HUMAN | KIF20B |
| sp P46013 KI67_HUMAN | MKI67 | sp Q6UN15 FIP1_HUMAN | FIPIL1 | sp O95251 KAT7_HUMAN | KAT7 |
| sp P12270 TPR_HUMAN | TPR | sp Q9NW82 WDR70_HUMAN | WDR70 | sp P61289 PSME3_HUMAN | PSME3 |
| sp P06748 NPM_HUMAN | NPM1 | sp Q9UQR0 SCML2_HUMAN | SCML2 | sp Q9NPF5 DMAPI1_HUMAN | DMAPI1 |
| sp P19338 NUCL_HUMAN | NCL | sp Q9ULD4 BRPF3_HUMAN | BRPF3 | sp P52272 HNRPM_HUMAN | HNRPM |
| sp O75182 SIN3B_HUMAN | SIN3B | sp P53999 TCP4_HUMAN | SUB1 | sp Q9H8H0 NOL11_HUMAN | NOL11 |
| sp Q9H307 PININ_HUMAN | PNN | sp O00541 PESC_HUMAN | PES1 | sp P18615 NELFE_HUMAN | NELFE |
| sp Q9Y265 RUVB1_HUMAN | RUVBL1 | sp Q8WXI9 P66B_HUMAN | GATAD2B | sp Q93009 UBP7_HUMAN | USP7 |
| sp P42167 LAP2B_HUMAN | TMPO | sp P09661 RU2A_HUMAN | SNRPA1 | sp Q96JM3 CHAP1_HUMAN | CHAMP1 |
| sp Q7L014 DDX46_HUMAN | DDX46 | sp Q9H583 HEAT1_HUMAN | HEATR1 | sp Q9P2D1 CHD7_HUMAN | CHD7 |
| sp Q13435 SF3B2_HUMAN | SF3B2 | sp Q969G3 SMCE1_HUMAN | SMA1 | sp P26358 DNMT1_HUMAN | DNMT1 |
| sp Q13206 DDX10_HUMAN | DDX10 | sp Q86YP4 P66A_HUMAN | GATAD2A | sp Q7Z6E9 RBBP6_HUMAN | RBBP6 |
| sp Q8IY81 SPB1_HUMAN | FTSJ3 | sp Q9H2F5 EPC1_HUMAN | EPC1 | sp P55081 MFAP1_HUMAN | MFAP1 |
| sp Q14526 HIC1_HUMAN | HIC1 | sp Q5T310 GPTC4_HUMAN | GPAT4 | sp Q9UPT8 ZC3H4_HUMAN | ZC3H4 |
| sp Q15233 NONO_HUMAN | NONO | sp P13984 T2FB_HUMAN | GTF2F2 | sp Q92576 PHF3_HUMAN | PHF3 |
| sp Q14839 CHD4_HUMAN | CHD4 | sp P18583 SON_HUMAN | SON | sp Q9UHB7 AFF4_HUMAN | AFF4 |
| sp Q13428 TCOF_HUMAN | TCOF1 | sp P15822 ZEP1_HUMAN | HIVEP1 | sp Q8WTT2 NOC3L_HUMAN | NOC3L |
| sp P38432 COIL_HUMAN | COIL | sp Q9Y2W2 WBP11_HUMAN | WBP11 | sp Q9Y4C8 RBM19_HUMAN | RBM19 |
| sp Q9UMN6 KMT2B_HUMAN | KMT2B | sp Q15459 SF3A1_HUMAN | SF3A1 | sp P49750 YLPM1_HUMAN | YLPM1 |

[0143]

| | | | | | |
|-----------------------|---------|-----------------------|---------|-----------------------|------------|
| sp Q9UHR5 S30BP_HUMAN | SAP30BP | sp Q76FK4 NOL8_HUMAN | NOL8 | sp Q8WWY3 PRP31_HUMAN | PRPF31 |
| sp P49321 NASP_HUMAN | NASP | sp O95696 BRD1_HUMAN | BRD1 | sp O75909 CCNK_HUMAN | CCNK |
| sp Q9ULW0 TPX2_HUMAN | TPX2 | sp Q8NI36 WDR36_HUMAN | WDR36 | sp Q96T58 MINT_HUMAN | SPEN |
| sp Q15652 JHD2C_HUMAN | JMJD1C | sp O60216 RAD21_HUMAN | RAD21 | sp Q96PZ0 PUS7_HUMAN | PUS7 |
| sp Q03164 KMT2A_HUMAN | KMT2A | sp O75663 TIPRL_HUMAN | TIPRL | sp Q2VIQ3 KIF4B_HUMAN | KIF4B |
| sp P61978 HNRPK_HUMAN | HNRNPK | sp O60563 CCNT1_HUMAN | CCNT1 | sp Q6IE81 JADE1_HUMAN | JADE1 |
| sp Q9BTC0 DIDO1_HUMAN | DIDO1 | sp P07737 PROF1_HUMAN | PFN1 | sp Q6PJT7 ZC3HE_HUMAN | ZC3H14 |
| sp Q8IX01 SUGP2_HUMAN | SUGP2 | sp Q16630 CPSF6_HUMAN | CPSF6 | sp Q8NI27 THOC2_HUMAN | THOC2 |
| sp O43290 SNUT1_HUMAN | SART1 | sp P49959 MRE11_HUMAN | MRE11 | sp Q9Y2U8 MAN1_HUMAN | LEMD3 |
| sp Q9H6Z4 RANB3_HUMAN | RANBP3 | sp Q9UHX1 PUF60_HUMAN | PUF60 | sp P21675 TAF1_HUMAN | TAF1 |
| sp P09874 PARP1_HUMAN | PARP1 | sp Q15637 SF01_HUMAN | SF1 | sp Q9H267 VP33B_HUMAN | VPS33B |
| sp Q92613 JADE3_HUMAN | JADE3 | sp Q99459 CDC5L_HUMAN | CDC5L | sp O75643 U520_HUMAN | SNRNP200 |
| sp Q15020 SART3_HUMAN | SART3 | sp Q13573 SNW1_HUMAN | SNW1 | sp P22626 ROA2_HUMAN | HNRNP A2B1 |
| sp Q96L91 EP400_HUMAN | EP400 | sp Q9UK61 TASOR_HUMAN | FAM208A | sp O60934 NBN_HUMAN | NBN |
| sp Q13823 NOG2_HUMAN | GNL2 | sp Q96KR1 ZFR_HUMAN | ZFR | sp Q8N7H5 PAF1_HUMAN | PAF1 |
| sp Q7Z5K2 WAPL_HUMAN | WAPL | sp Q5T8P6 RBM26_HUMAN | RBM26 | sp O75376 NCOR1_HUMAN | NCOR1 |
| sp P46108 CRK_HUMAN | CRK | sp O43719 HTSF1_HUMAN | HTATSF1 | sp Q13123 RED_HUMAN | IK |
| sp P78347 GTF2I_HUMAN | GTF2I | sp O95239 KIF4A_HUMAN | KIF4A | sp Q14739 LBR_HUMAN | LBR |
| sp Q8TDI0 CHD5_HUMAN | CHD5 | sp Q14692 BMS1_HUMAN | BMS1 | sp Q03188 CENPC_HUMAN | CENPC |
| sp Q9Y2W1 TR150_HUMAN | THRAP3 | sp O43143 DHX15_HUMAN | DHX15 | sp Q9P013 CWC15_HUMAN | CWC15 |
| sp Q12873 CHD3_HUMAN | CHD3 | sp Q92541 RTF1_HUMAN | RTF1 | sp Q13330 MTA1_HUMAN | MTA1 |

[0144]

| | | | | | |
|-----------------------|---------|------------------------|---------|-------------------------|-----------|
| sp O75533 SF3B1_HUMAN | SF3B1 | sp Q14966 ZN638_HUMAN | ZNF638 | sp P53814 SMTN_HUMAN | SMTN |
| sp P55201 BRPF1_HUMAN | BRPF1 | sp O14776 TCERG1_HUMAN | TCERG1 | sp P52597 HNRPF_HUMAN | HNRNPF |
| sp P53680 AP2S1_HUMAN | AP2S1 | sp Q14241 ELOA1_HUMAN | ELOA1 | sp Q9BWU0 NADAP_HUMAN | SLC4A1AP |
| sp O60885 BRD4_HUMAN | BRD4 | sp P29590 PML_HUMAN | PML | sp Q7Z5J4 RAI1_HUMAN | RAI1 |
| sp P42166 LAP2A_HUMAN | TMPO | sp Q9BRR8 GPTC1_HUMAN | GPATC1 | sp Q6NZY4 ZCHC8_HUMAN | ZCCHC8 |
| sp Q5VUA4 ZN318_HUMAN | ZNF318 | sp P23246 SFPQ_HUMAN | SFPQ | sp Q3L8U1 CHD9_HUMAN | CHD9 |
| sp Q52LR7 EPC2_HUMAN | EPC2 | sp Q9HIE3 NUCKS_HUMAN | NUCKS1 | sp Q92917 GPKOW_HUMAN | GPKOW |
| sp O00763 ACACB_HUMAN | ACACB | sp Q96T23 RSF1_HUMAN | RSF1 | sp P28340 DPOD1_HUMAN | POLD1 |
| sp O15042 SR140_HUMAN | U2SURP | sp Q5QJE6 TDIF2_HUMAN | DNTTIP2 | sp Q69YH5 CDCA2A2_HUMAN | CDCA2 |
| sp Q9ULM3 YETS2_HUMAN | YEATS2 | sp Q5UIP0 RIF1_HUMAN | RIF1 | sp Q8N163 CCAR2_HUMAN | CCAR2 |
| sp Q13263 TIF1B_HUMAN | TRIM28 | sp Q14814 MEF2D_HUMAN | MEF2D | sp P43243 MATR3_HUMAN | MATR3 |
| sp Q86VM9 ZCH18_HUMAN | ZC3H18 | sp Q14865 ARID5B_HUMAN | ARID5B | sp Q86YC2 PALB2_HUMAN | PALB2 |
| sp Q1ED39 KNOP1_HUMAN | KNOP1 | sp Q92794 KAT6A_HUMAN | KAT6A | sp O00566 MPP10_HUMAN | MPHOSPH10 |
| sp P51003 PAPOA_HUMAN | PAPOLA | sp Q9H4I2 ZHX3_HUMAN | ZHX3 | sp Q96QC0 PPP1R1A_HUMAN | PPP1R10 |
| sp Q8WYP5 EYS_HUMAN | AHCTF1 | sp Q92945 FUBP2_HUMAN | KHSRIP | sp Q9Y4E5 ZN451_HUMAN | ZNF451 |
| sp Q9H5V9 CXO56_HUMAN | CXorf56 | sp Q02241 KIF23_HUMAN | KIF23 | sp Q8NFC6 BD1L1_HUMAN | BOD1L1 |
| sp Q9H0A0 NAT10_HUMAN | NAT10 | sp O00567 NOP56_HUMAN | NOP56 | sp O95391 SLU7_HUMAN | SLU7 |
| sp P55265 DSRAD_HUMAN | ADAR | sp Q7Z4V5 HDGR2_HUMAN | HDGFL2 | sp O15381 NVL_HUMAN | NVL |
| sp P98175 RBM10_HUMAN | RBM10 | sp Q96PV6 LENG8_HUMAN | LENG8 | sp A3KN83 SBNO1_HUMAN | SBNO1 |
| sp Q08211 DHX9_HUMAN | DHX9 | sp Q9HCS7 SYF1_HUMAN | XAB2 | sp Q9NQC1 JADE2_HUMAN | JADE2 |
| sp Q9NYF8 BCLF1_HUMAN | BCLAF1 | sp Q12789 TF3C1_HUMAN | GTF3C1 | sp O94913 PCF11_HUMAN | PCF11 |

[0145]

| | | | | | |
|-----------------------|-----------|-----------------------|---------|-----------------------|---------|
| sp Q9HCK8 CHD8_HUMAN | CHD8 | sp Q9BVJ6 UT14A_HUMAN | UTP14A | sp Q9UBC2 EP15R_HUMAN | EPS15L1 |
| sp Q86XP3 DDX42_HUMAN | DDX42 | sp Q12888 TP53B_HUMAN | TP53BP1 | sp P33991 MCM4_HUMAN | MCM4 |
| sp Q9BQG0 MBB1A_HUMAN | MYBBP1A | sp Q9UBB9 TFP11_HUMAN | TFIP11 | sp P46109 CRKL_HUMAN | CRKL |
| sp Q8IWZ8 SUGP1_HUMAN | SUGP1 | sp Q9Y2X3 NOP58_HUMAN | NOP58 | sp Q8TEK3 DOT1L_HUMAN | DOT1L |
| sp Q9H501 ESF1_HUMAN | ESF1 | sp Q15061 WDR43_HUMAN | WDR43 | sp Q6PL18 ATAD2_HUMAN | ATAD2 |
| sp Q6IN85 P4R3A_HUMAN | PPP4R3A | sp P35637 FUS_HUMAN | FUS | sp Q96JK2 DCAF5_HUMAN | DCAF5 |
| sp O75152 ZC11A_HUMAN | ZC3H11A | sp Q96RE7 NAC1_HUMAN | NAC1 | sp Q13129 RLF_HUMAN | RLF |
| sp Q03701 CEBPZ_HUMAN | CEBPZ | sp O75717 WDHD1_HUMAN | WDHD1 | sp Q2NL82 TSR1_HUMAN | TSR1 |
| sp P46100 ATRX_HUMAN | ATRX | sp Q15648 MED1_HUMAN | MED1 | sp Q14684 RRP1B_HUMAN | RRP1B |
| sp P17480 UBF1_HUMAN | UBTF | sp Q9NQZ2 SAS10_HUMAN | UTP3 | sp O75150 BRE1B_HUMAN | RNF40 |
| sp Q9NR30 DDX21_HUMAN | DDX21 | sp Q9NXR8 ING3_HUMAN | ING3 | sp P28715 ERCC5_HUMAN | ERCC5 |
| sp Q9P2N5 RBM27_HUMAN | RBM27 | sp O00193 SMAP_HUMAN | SMAP | sp Q9BSC4 NOL10_HUMAN | NOL10 |
| sp P17844 DDX5_HUMAN | DDX5 | sp Q8WUQ7 CATIN_HUMAN | CACTIN | sp Q14687 GSE1_HUMAN | GSE1 |
| sp Q96KK5 H2A1H_HUMAN | HIST1H2AH | sp Q5JTH9 RRP12_HUMAN | RRP12 | sp Q03111 ENL_HUMAN | MLLT1 |
| sp Q01780 EXOSX_HUMAN | EXOSC10 | sp Q8IWX8 CHERP_HUMAN | CHERP | sp Q92620 PRP16_HUMAN | DHX38 |
| sp Q96EV2 RBM33_HUMAN | RBM33 | sp Q15059 BRD3_HUMAN | BRD3 | sp P51587 BRCA2_HUMAN | BRCA2 |
| sp Q7LBC6 KDM3B_HUMAN | KDM3B | sp O00148 DX39A_HUMAN | DDX39A | sp P05455 LA_HUMAN | SSB |
| sp Q96ST3 SIN3A_HUMAN | SIN3A | sp P49790 NU153_HUMAN | NUP153 | sp Q6P2Q9 PRP8_HUMAN | PRPF8 |
| sp O43395 PRPF3_HUMAN | PRPF3 | sp P46087 NOP2_HUMAN | NOP2 | sp P26599 PTBP1_HUMAN | PTBP1 |
| sp Q5VT52 RPRD2_HUMAN | RPRD2 | sp Q14690 RRP5_HUMAN | PDCD11 | sp P12956 XRCC6_HUMAN | XRCC6 |

[0146]

[0147]

메닌 억제제(단독 또는 MOZ 억제제와 병용)에 의한 MEAF6 근위 프로테오믹스의 변화를 평가하기 위해, MEAF6-BirA 발현 GIST-T1 세포를 비오틴으로 표지하고 질량 분석법을 사용하여 후속 무표지 정량화하기 전에 VTP-50469 단독 또는 WM-1119과 병용으로 3일 동안 전처리했다. MEAF6-근위 단백질의 대부분은 동일하게 유지되었지만, 단백질의 서브세트는 약물 처리에 따라 상당한 변화를 보였으며, VTP-50469 및 WM-1119에서 관찰된 변화에서 유의미한 상관관계를 보였다(도 6d). MLL 계열 구성원인 KMT2A/MLL1, KMT2B/MLL2 및 DNA 및 RNA 결합 항-세포사멸 단백질 GPATCH4 (Lambert *et al.*, J. Proteomics 118 :81-94 (2015)) 상호작용은 VTP-50469 단독 처리 시 감소했으며, VTP-50469와 WM-1119의 병용 처리한 경우 추가 효과가 없었다(도 6f). 선택된 염색질 조절자, 스플라이싱 인자 및 증합효소 조절 단백질의 근접성은 VTP-50469 단독 또는 WM-1119와 병용한 경우 유사한 방식으로 변경되었으며, 특히 DOT1L은 모든 처리 조건에서 유의미하게 감소했다(도 6g).

[0148]

메닌 억제제가 DOT1L의 염색질 결합을 어떻게 변경했는지 확인하기 위해, GIST-T1 세포의 스파이크-인 정규화된 ChIP-seq를 VTP-50469 단독 또는 병용으로 처리하였고, 이는 도 6g 내지 6i 및 도 13g 내지 13i에 도시된 바와 같이, 모든 DOT1L 결합 부위에서 염색질과 DOT1L의 결합을 유의미하게 감소시켰으며, 게놈-전체의 평균 DOT1L 신호가 감소되었다. 도 6g는 DMSO, VTP-50469로 3일 동안 처리한 GIST-T1 세포 내 MACS-정의된 피크

(n=67,769)에서 DOT1L의 스파이크-인 정규화된 신호를 보여주는 히트 맵이다. 피크 중앙에서 $\pm 1.25\text{kb}$ 의 스케일링된 표시된 리드 밀도는 행으로 표시된다. 도 6i 내지 6j는 DOT1L 신호의 경우 n이 67,769이고 MEAF6 신호의 경우 n이 22,581이다; ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$.

[0149] 다른 메닌-MLL 복합체 구성원과 마찬가지로 DOT1L, H3K79me2, DOT1L에 의해 기탁된(deposited) 히스톤 마크 및 MEAF6은 모두 활성 유전자의 TSS 및 유전자 본체에서 광범위한 게놈 농축을 나타냈고, 도 6k 및 도 13b 내지 13e에 도시된 바와 같이 GIST 생물학과 관련된 유전자좌에서의 농축 및 VTP-50469 처리를 통한 DOT1L 신호의 감소를 나타냈다. 도 13d는 ChIP-seq에 의한 DOT1L의 GIST-T1 및 H3K79me2에서의 게놈 국소화를 보여주는 히트 맵이다. TSS, H3K27ac-정의된 슈퍼 인핸서 또는 ATAC-정의된 피크에서 스케일링된 리드 밀도 $\pm 10\text{kb}$ 가 행으로 표시된다. 도 13e는 GPR20 유전자좌에서 표시된 처리, H3K79me2 및 H3K27ac 하에서 스파이크-인 정규화된 DOT1L의 게놈 점유 영역을 보여주는 트랙을 포함한다. DOT1L TE vs SE. SE = 1343, TE = 45256. Welch의 T-검정 $P < 0.001$, 절대 차이 $\sim 1\%$. DOT1L 기능의 상실이 메닌 억제 하류의 세포 독성 메커니즘을 구성할 수 있는지 여부를 추가로 조사하기 위해, 대조군인 GIST-T1 세포 또는 GIST48B를 다양한 용량의 선택적 DOT1L 억제제 EPZ-5676에서 시간 경과에 따른 성장 분석으로 처리했다. 테스트된 모든 용량에서, GIST-T1은 DMSO 대조군 또는 GIST48B(조건당 5개)에 비해 유의미하게 감소된 세포 증식을 나타냈는데, 이는 도 6l에 도시된 바와 같이 메닌 억제와 유사한 DOT1L 억제의 선택적 독성을 나타낸다.

[0150] DOT1L-표적화 sgRNA는 게놈-규모 CRISPR 스크린의 결과와 일치하는, 메닌-MLL 및 MOZ 복합체-표적화 sgRNA에서 볼 수 있는 것보다 더 완만하지만, GIST-T1 세포 증식의 상당한 감소를 가져왔다(도 2a 및 도 13i). GIST에서 DOT1L 억제의 전사 결과를 더 잘 특성화하기 위해, GIST-T1 세포를 EPZ-5676으로 5일 동안 처리한 후 RNA-seq를 처리했다. 전반적으로, EPZ-5676 처리와 연관된 전사 변화는 이전에 MLL-재배열 백혈병에서 관찰된 현상인 VTP-50469에 의한 메닌 억제로 인해 발생하는 것과 높은 상관관계가 있었다(도 6m 및 도 6n). 메닌-MLL 및 MOZ 억제와 마찬가지로, DOT1L 억제는 KIT, CD34, NPR3 및 GIST TF의 발현 변화와 함께(도 6p 내지 6q), HAND1-조절된 전사 프로그램에 상당한 파괴를 초래했다(도 6o). 함께, 데이터는 이러한 후생유전학적 복합체 사이의 근위 단백질 상호작용의 복잡성, MOZ 또는 메닌 억제를 통한 다중 전사 조절자의 단백질 및 염색질 연관성의 변화, 및 DOT1L 기능이 MOZ 또는 메닌 억제의 하류 결과로서 작용하는 DOT1L의 염색질 연관성의 손실과 함께, KIT-의존성 GIST에 의존한다는 것을 보여준다. 위에서, 시간 경과에 따른 성장 실험은 GIST48B와 비교하여, Tukey의 사후 테스트를 사용한 이원 분산 분석으로 분석하였다; ***, $P < 0.001$; *, $P < 0.05$. 함께, 이러한 데이터는 이러한 후생유전학적 복합체 사이의 근위 단백질 상호작용의 복잡성, 메닌 억제를 통한 다중 전사 조절자의 단백질 및 염색질 연관성의 변화, 및 DOT1L 기능이 메닌 억제의 하류 결과로서 작용하는 DOT1L의 염색질 연관성의 손실과 함께, KIT-의존성 GIST에 의존한다는 것을 보여준다.

[0151] 실시예 6: 생체 내에서 단독으로 또는 TKI와 병용한 메닌 억제제의 치료 효과.

[0152] 생체 내 종양 성장에 대한 KAT6A, 메닌 또는 DOT1L의 유전적 손실 효과를 평가하기 위해, Cas9을 공동-발현하는 GIST-T1 세포에서 KAT6A (sgKAT6A), 메닌 (sgMEN1) 또는 DOT1L (sgDOT1L) 또는 루시페라제 대조군 (sgLuc) 각각에 대해 지시된 sgRNA를 발현하는 세포를 준비했다. 동일한 수의 변형된 세포를 이식한 후, 마우스의 종양 형성 및 성장을 모니터링했다. 모든 이식물이 종양을 생성했지만, sgKAT6A 또는 sgMEN1로 처리된 세포에서 유래된 이식물은 sgLuc 대조군에 비해 성장이 유의미하게 감소한 반면, sgDOT1L의 발현은 성장 감소 경향이 미미한 것으로 나타났다(도 14d). 성장 제한은 유사한 시험관 내 실험보다 더 완만했지만(도 2h 및 도 13i), sgKAT6A 및 sgMEN1 조건은 이식을 위한 충분한 세포를 생산하기 위해 시험관 내에서 2주 동안 선택 및 증식이 필요했으며, 아마도 덜 유해한 유전자 변형이 있는 세포를 선택할 가능성이 높다.

[0153] 국가임상시험 (National Clinical Trials: NCT) 번호 NCT04067336 (화합물 KO539에 대한 연구), NCT04811560 (화합물 JNJ-75276617에 대한 연구), 및 NCT04065399 (화합물 SNDX-5613에 대한 연구)를 포함하는 다중 메닌 억제제가 백혈병 치료를 위한 초기 단계 임상시험에 진출했다. KO539는 Unii-4mod1F4enc 및 지프트메닙(ziftomenib)으로도 알려져 있다.

[0154] 생체 내에서 단독으로 또는 WM-1119 또는 이마티닙과 병용으로 메닌 억제 효과를 평가하기 위해, 마우스에 GIST-T1 세포를 이식하고 이마티닙(n=5), VTP-50469(떡이에 지속적으로 투여, n=4), WM-1119(매주 7일, 1일 3회 투여 n=6), VTP-50469와 WM-1119의 병용(n=6), 이마티닙과 VTP-50469의 병용(n=5), 또는 비히클 대조군(n=5)으로 처리했다. 28일의 처리 기간이 끝난 후, 단독요법 치료그룹은 비히클에 비해 종양 성장이 유사하게 유의미하게 감소한 반면, 병용요법 그룹은 종양 성장이 완전히 중단된 것으로 나타났다. 추가 약물 처리 없이 종양 회복 모니터링이 지속되었으며, 이마티닙 및 VTP-50469 단독요법 그룹의 종양은 비히클 그룹과 유사한 중

양 성장 궤적을 회복한 반면, 이마티닙과 VTP-50469의 병용 그룹은 도 7a에서와 같이, 3-4배 감소된 종양 회복 기율기를 유지했다. 기준선에 대한 종양 부피는 비히클 대조군의 경우 표 5, VTP-50469의 경우 표 6, WM-1119의 경우 표 7, VTP-50469와 WM-1119의 병용의 경우 표 8에 자세히 설명되어 있다. 추가 약물 처리 없이 종양 회복을 지속적으로 모니터링하는 동안, 모든 조건은 비히클 대조군과 유사한 종양 성장률을 보였다. 도 7d에 도시된 바와 같이, VTP-50469와 WM-1119의 병용 요법은 이마티닙 및 VTP-50469 요법과 유사한 종양 성장 궤적을 보였다. 마우스는 명백한 독성이나 체중 감소 없이 WM-1119, VTP-50469, 이마티닙 및 이들의 병용 처리를 견뎌다 (도 14e 내지 도 14f).

[0155] 표 5: 기준선 대비 비히클 대조군 종양 부피

| 처리 일수 | 동물 | | | | |
|-------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 5 | 167 | 184 | 239 | 171 | 243 |
| 8 | 177 | 325 | 426 | 193 | 335 |
| 12 | 213 | 389 | 502 | 225 | 379 |
| 14 | 259 | 405 | 546 | 253 | 510 |
| 19 | 265 | 430 | 683 | 255 | 664 |
| 22 | 317 | 438 | 713 | 487 | 689 |
| 27 | 368 | 455 | 948 | 593 | 759 |
| 29 | 384 | 522 | 967 | 578 | 876 |

[0156]

[0157] 표 6: 기준선 대비 VTP-50469 종양 부피

| 처리 일수 | 동물 | | | | | |
|-------|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 1 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 5 | 191 | 172 | 102 | 182 | 68 | 160 |
| 8 | 201 | 188 | 107 | 178 | 67 | 284 |
| 12 | 221 | 290 | 90 | 176 | 59 | 486 |
| 14 | 265 | 356 | 136 | 276 | 73 | 519 |
| 19 | 383 | 399 | 188 | 379 | 43 | 832 |
| 22 | 353 | 440 | 128 | 480 | 71 | 1108 |
| 27 | 622 | 466 | 119 | 735 | 80 | 1469 |
| 29 | 773 | 461 | 153 | 962 | 92 | * |

[0158]

[0159] *급속한 종양 성장으로 인해 마우스가 조기에 사망하였다.

[0160] 표 7: 기준선 대비 WM-1119 종양 부피

| 처리 일수 | 동물 | | | | | |
|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 1 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 5 | 175 | 211 | 114 | 133 | 87 | 152 |
| 8 | 480 | 322 | 157 | 173 | 131 | 206 |
| 12 | 518 | 368 | 287 | 160 | 145 | 260 |
| 14 | 527 | 429 | 327 | 181 | 163 | 328 |
| 19 | 876 | 501 | 511 | 180 | 268 | 277 |
| 22 | 878 | 409 | 489 | 150 | 205 | 361 |
| 27 | 856 | 525 | 558 | 202 | 232 | 317 |
| 29 | 874 | 532 | 648 | 199 | 221 | 353 |

[0161]

[0162] 표 8: 기준선 대비 VTP-50469와 WM-1119 병용의 종양 부피

| 처리 일수 | 동물 | | | | | |
|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 1 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 5 | 100 | 128 | 79 | 242 | 159 | 103 |
| 8 | 119 | 138 | 90 | 288 | 138 | 115 |
| 12 | 98 | 111 | 66 | 384 | 104 | 92 |
| 14 | 71 | 104 | 64 | 316 | 114 | 121 |
| 19 | 79 | 123 | 45 | 445 | 45 | 98 |
| 22 | 61 | 155 | 53 | 493 | 49 | 112 |
| 27 | 32 | 159 | 43 | 518 | 46 | 101 |
| 29 | 67 | 198 | 46 | 613 | 57 | 98 |

[0163]

[0164]

이마티닙 및/또는 VTP-50469 처리 5일 및 10일 후 GIST-T1 이종이식에 대한 RNA-seq를 수행하여 생체 내 메닌 및/또는 KIT 억제로 인해 발생하는 GIST 전사 프로그램의 변화를 평가했다. 모든 치료 조건에서 비히클 대조군과 비교하여 전역적인 전사 변화를 가져왔지만, 두 시점 모두에서 VTP-50469 및 이마티닙과 VTP-50469의 병용으로 처리한 후 더 큰 변화가 나타났으며, 이마티닙 처리의 유전자 발현 프로파일은 비히클-처리된 종양과 더 밀접한 상관관계가 있다 (도 7e). 도 7e는 모든 발현된 유전자의 백만 매핑된 리드 당 전사체의 킬로베이스당 그룹-평균 단편(FPKM)의 피어슨 상관관계를 보여준다 (FPKM >10, n = 7,434). 이마티닙, VTP-50469 및 병용 처리는 모두 HAND1에 의해 조절되는 유전자의 발현을 감소시켰다 (도 14g). KIT, CD34 및 NPR3을 포함한 GIST-연관 전사체는 VTP-50469 처리에 의해 우선적으로 감소되었지만, TMEM100 및 SPRY2를 포함한 다른 KIT-신호전달-의존성 전사체는 이마티닙 치료로 우선적으로 감소했다. 세포 증식의 마커인 PCNA는 5일 및 10일 시점 모두에서 이마티닙 VTP-50469의 병용으로만 감소되었으며 (도 7f), 이는 병용 처리가 종양 성장에 미치는 더 큰 효과와 일치한다.

[0165]

다음으로, GIST의 KIT 돌연변이 환자 유래 이종이식(PDX) 모델인 (문헌 [Hemming *et al.*, Cancer Res. 79(5):994-1009 (2019)]) PG27에 대한 이마티닙 및 VTP-50469 처리의 효과를 평가했다. 최대 허용 용량 미만의 이마티닙 투여는 GIST-T1 세포주 이종이식에 비해 유의미하지만 완전한 수준의 성장 억제 효과를 보인 반면, VTP-50469 단독(n=5) 또는 이마티닙과의 병용(n=5) 처리는 도 7b에 도시된 바와 같이 종양 성장을 유의미하게 감소시켰다. 데이터는 비히클과 비교하여 이원 분산 분석을 통해 분석하였다; ***, P<0.001; 이마티닙과 비교; #, P<0.01. 먹이 내 VTP-50469로 처리된 마우스(n=5)는 GIST-T1 이종이식 실험에서 체중 감소를 나타내지 않은 반면, 동일한 농도에서 다른 배치(batch)의 VTP-50469로 처리된 PG27 마우스는 적당한 체중 감소를 나타냈다 (도 14a 내지 14b 참조, 이원 분산 분석에 의해 분석된 데이터, 대조군과 비교; *, P<0.05). 처리 기간이 끝나면, 종양 조직학(histology)을 평가하기 위해 PG27 종양을 수확하고, 고정하고 절개했다. 비히클 및 이마티닙 처리된 종양은 종양 세포의 단일형(monomorphic) 시트를 갖는 반면, VTP-50469 또는 약물 병용으로 처리된 이종이식은 도 7c에 도시된 바와 같이 종양 괴사 영역을 나타냈다. 도 7c의 대표적인 이미지는 처리 그룹을 4x 배율

(상부 패널, 스케일 바 = 250 μm) 및 40x 배율(하부 패널, 스케일 바 = 25 μm)으로 보여준다. VTP-50469 처리로 종양 성장이 제한되었음에도 불구하고, 종양의 생존 가능한 영역은 조건 전반에 걸쳐 Ki-67 및 절단된 카스파제-3과 유사한 수준을 나타냈다 (도 14c 참조, 여기서 PG27 종양을 처리 기간 말기에 수확하고 고정된 조직을 절개하여 Ki-67(상단 행) 및 절단된 카스파제-3(하단 행)에 대해 평가함; 스케일 바= 25 μm). 먹이에서 VTP-50469를 처리한 마우스는 GIST-T1 이종이식 실험에서 체중 감소를 나타내지 않은 반면, 동일한 농도의 VTP-50469를 처리한 PG27-생착 마우스는 적당한 체중 감소를 나타냈으며 (도 14b), 이는 관찰된 종양 괴사의 전신 효과와 관련이 있을 수 있다. VTP-50469 처리로 종양 성장이 제한되었음에도 불구하고, 종양의 생존 가능한 영역은 조건 전반에 걸쳐 유사한 수준의 Ki-67 및 절단된 카스파제-3를 나타냈다 (도 14b). 이들 데이터는 VTP-50469 단독 또는 이마티닙과 병용 시 메닌 억제가 GIST 이종이식 성장을 감소시키고, 종양 괴사를 일으키며, 이마티닙과 병용 시 치료 중단 후 지속적인 항-종양 반응을 생성한다는 치료 활성을 입증한다.

[0166] 이러한 구현에는 염색질의 조직화 및 리모델링이 세포 계통, 식별 및 기능에 필수적이라는 것을 보여준다. 히스톤의 번역 후 변형은 TF와 염색질 조절자의 결합을 제어하고 궁극적으로 유전자 발현과 염색체 구조를 관리하는 후생학적 조절의 연결점(nexus) 역할을 한다. 염색질 변형은 역동적이고 가역적이며, 세포 유형 및 상태 특정 염색질 변형 효소에 의한 적극적인 유지가 필요하다. 암은 발암유전자(oncogene) 활성화를 허용하는 환경의 유지 또는 *MLL* 유전자 융합과 같은 염색질 조절자의 기능 획득(gain-of-function) 변형을 통해, 악성 표현형을 유지하기 위해 전구 세포의 염색질 상태를 이용하거나 적절하게 활용한다 (문헌 [Krivtsov *et al.*, *Nat. Rev. Cancer* 7:823-33 (2007)]). 여기서, 본 개시는 특정 염색질 조절자가 GIST 후성유전체를 유지하는 데 필수적이며, 메닌-*MLL* 복합체가 게놈 전체에서 활발하게 발현되는 유전자에 결합하여, GIST-연관 유전자 발현 프로그램을 조절하고, 여러 유전자 발현 조절자 간의 단백질-단백질 상호작용을 조정하며, 궁극적으로 세포 증식 및 종양 성장을 조절한다는 것을 보여준다.

[0167] *MEN1* 유전자에 의해 암호화된 메닌은 전통적으로 종양 억제자로 설명되어 왔으며, *MEN1*의 돌연변이는 내분비 종양 형성을 촉진한다고 알려져 왔다. 그러나, 다른 조직에서는 유전자 발현을 양성 또는 음성적으로 조절하고, 다양한 염색질 복합체와 결합하고, 상류 신호 전달 경로로부터의 입력을 통합하고, DNA 복제 및 복구를 조절하는 단백질의 능력으로 인해 발생하는 메닌의 다양한 기능이 알려져 있다 (문헌 [Matkar *et al.*, *Trends Biochem. Sci.* 38(8):394-402 (2013)]). 메닌은 *MLL* 융합 단백질에 결합하고 *DOT1L*의 모집과 함께 백혈병 유전자 발현 프로그램을 실행하는 *MLL*-재배열 백혈병의 맥락에서 발암성 의존성으로 가장 잘 연구되어 왔다 (문헌 [Krivtsov *et al.*, *Cancer Cell* 36:660-673 (2019)], [Yokoyama *et al.*, *Cell* 123:207-18 (2005)], [Dafflon *et al.*, *Leukemia* 31:1269-77 (2017)]). GIST에서 메닌-*MLL* 복합체 구성원은 전반적인 염색질 조절과 궁극적으로 종양 세포 증식에 필수적이다. 프로젝트 드라이브 및 DepMap에서 프로파일링된 수백 가지 다른 세포 유형과 비교할 때, GIST는 메닌-*MLL* 복합체 구성원의 표적 파괴에 대한 탁월한 민감도를 가지고 있다. KIT-의존성 GIST에서 TF의 보존과 전사 및 염색질 환경과 일치하여 (문헌 [Hemming *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115:E5746-55 (2018)], [Dafflon *et al.*, *Leukemia* 31:1269-77 (2017)]), KIT-비의존성 GIST 세포주에서 유전적 또는 약리학적으로 메닌-*MLL* 복합체 파괴에 대한 민감도가 손실되었다. 이러한 데이터는 *MLL*-재배열 백혈병에서 나타나는 발암성 하이재킹(hijacking)과 달리, GIST가 악성 유전자 발현 프로그램의 기초를 제공하는 염색질 환경을 유지하기 위해 메닌-*MLL* 복합체의 고유 기능 및 관련 의존성에 의존한다는 것을 나타낸다.

[0168] 여러 증거는 전사 조절에서 메닌-*MLL*, *MOZ* 및 기타 복합체 간의 협력을 시사한다. 여기서, 본 개시는 활발하게 발현되는 유전자의 TSS에서 메닌-*MLL* 및 *MOZ* 복합체 구성원의 게놈 전반에 걸친 공동-국소화, 두 복합체의 억제에 따른 유전자 발현의 유사한 변화, 두 복합체 간의 근위 단백질 상호작용, *DOT1L* 및 기타 전사-연관 단백질의 조정된 조절, 및 메닌-*MLL* 복합체 억제와 함께 *MOZ* 복합체 억제 시 세포 주기 및 세포 증식에 미치는 영향이 더 뚜렷하게 나타났다는 점을 보여준다. 여기에 개시된 내용과 일치하여, 유전자 발현을 촉진하는 *MOZ*와 *MLL* 복합체 사이의 상호작용은 조혈 전구 세포의 *HOXA* 유전자좌에서 이전에 기술되었다. DepMap 데이터를 활용하여, 본 개시는 소수의 암 세포주에서 이들 염색질 조절 복합체의 이전에 과소평가되고 상보적인 유전적 공동-의존성을 강조한다. *PRC2* 복합체에 대한 의존성은 DepMap 데이터 전반에 걸쳐 관찰된 유사한 공동-의존성과 함께 GIST에서도 나타났고, 이는 메닌-*MLL* 복합체의 활성화 기능의 균형을 유지하는 염색질 침묵(silencing)에서 *PRC2*의 대조적이지만 보완적인 역할을 시사한다.

[0169] 이러한 데이터는 또한 메닌-*MLL*과 *PRC2* 복합체가 염색질 상태 및 전사 출력(output)을 제어하기 위해 게놈 전체에서 협력적으로 기능한다는 것을 시사한다. 본 개시는 세포 주기 및 세포 증식 분석에서 VTP-50469 단독 또는 *WM-1119*와 병용한 경우, 메닌-*MLL* 및 *MOZ* 복합체의 동시 억제의 우수한 활성을 강조하지만, 선택된 GIST 연관 유전자의 발현 및 단백질-단백질 상호작용의 파괴는 단일요법과 병용요법 간에 대체로 유사했다. 병용 독성의

메커니즘은 추가 조사가 필요하지만, 이러한 결과는 하나의 복합체가 파괴되면 특정 표적 유전자좌에서 두 복합체를 모두 탈규제(deregulate)될 수 있으며, 메닌-MLL 및 MOZ 복합체의 중첩되지 않는 기능이 존재할 가능성이 있음을 시사한다.

[0170] 게놈 전체에 걸친 활성 유전자의 TSS와의 연관성과 일치하여, 메닌-MLL 복합체의 파괴는 특정 경로에서 적당하고 농축된 전사의 광범위한 변화를 가져왔다. 이러한 염색질 복합체의 가장 많이 농축된 유전자는 메닌 억제로 유전자 발현이 현저히 감소했다. 본 개시는 또한 이마티닙 처리에 의해 하향 조절되는 유전자뿐만 아니라 GIST에 필수적인 유전자의 전사의 불균형한 감소를 보여주며, 이는 메닌-MLL 복합체가 KIT 신호전달의 하류에서 전사를 지원하는 데 있어 기본적인 역할을 한다는 것을 암시한다. GSEA를 사용하면, 메닌 억제로 인해 발생하는 전사 변화가 세포 주기 감소, 분열 촉진 신호 전달, 발달 및 EMT 프로그램 활성화를 나타내는 유전자 세트와 유의하게 연관되어 있음을 알 수 있다. 이전 연구에서는 덜 공격적인 형태의 GIST에서 또는 발암성 TF HAND1의 중단 이후 EMT 시그니처(signature)의 상향 조절이 관찰되었으며, 이는 전사 경로가 TF 파괴 또는 약리학적 염색질 조절자 억제와 함께 수렴함을 나타낸다. 메닌-MLL 파괴가 유전자 발현에 약간의 변화를 일으킨 것과 일치하여, 증식 및 세포 주기에 대한 영향은 이마티닙의 급성 독성 효과와는 대조적으로 약물 치료 며칠 후에만 관찰되었다.

[0171] 메닌 억제의 하류 결과에는 염색질로부터 DOT1L의 손실을 포함하여, 본원에 개시된 다중 전사 조절자 사이의 근위 상호작용의 파괴가 포함된다. DOT1L은 H3K79를 메틸화하여 활성 전사 상태를 지원하며, 이는 MLL 융합 단백질에 의한 모집이 백혈병 발생에 필수적인 백혈병에서 조사되었다. 고형 종양에서, DOT1L은 발암성 전사 인자와 협력하는 것으로 밝혀졌지만(문헌 [Wong *et al.*, Cancer Research 77:2522-33 (2017), Vatapalli *et al.*, Nat. Commun. 11(1):4153 (2020)]), DOT1L 억제제는 지금까지 고형 종양에 대한 임상 시험에서 평가되지 않았다. GIST에서 TF 의존성을 입증하는 이전 연구와, DOT1L 유전적 및 약리학적 파괴에 대한 GIST 세포의 취약성을 보여주는 현재 연구를 통해, DOT1L은 선택된 암-연관 유전자의 전사 활성 상태를 확립하는 데 TF 및 메닌-MLL 복합체 활성의 하류 통합자(integrator) 역할을 할 수 있다.

[0172] 종합하면, 이들 데이터는 염색질 조절 및 발암성 유전자 발현 프로그램의 필수 구성요소 역할을 하는, GIST의 메닌-MLL 복합체의 필수 기능을 보여준다.

[0173] 메닌과 MLL 사이의 결합을 파괴하는 다수의 메닌 억제제가 개발되었고(문헌 [Krivtsov *et al.*, Cancer Cell. 36(6):660-673 (2019)], [Klossowski *et al.*, J. Clin. Invest. 130:981-97 (2020)], [Xu *et al.*, J. Med. Chem. 63:4997-5010 (2020)]), 현재 백혈병에 대한 임상 조사가 진행 중이다. GIST의 이중이식 모델에 대한 메닌 억제의 생체내 효과를 평가하기 위해, 본 개시는 TKI, 메닌 억제 또는 병용 치료를 이용한 세포주 및 환자 유래 이중이식의 치료를 설명하며, 이는 단일요법으로서 메닌 억제의 활성을 입증하며, TKI 및 메닌 억제의 병용에서는 더 큰 활성을 보여준다. 치료 기간 후, 두 단독요법 군(arm)의 종양은 성장 제적을 회복한 반면, 메닌 억제와 TKI 병용요법으로 치료된 종양은 치료 중단 후 몇 주 후에 관찰된 장기간의 종양 억제 효과를 유지했다. 상기 개시에서 GIST의 PDX 모델은 메닌 억제의 강력한 항종양 활성을 보였으며, 조직학은 생존 가능한 종양에 산재된 괴사 영역을 보여준다. 이러한 결과는 단독으로 또는 이상적으로는 GIST 환자를 위한 TKI와 병용한 메닌 억제제의 임상 개발을 뒷받침한다.

[0174] TKI는 세포독성 화학요법에 대한 고유 내성이 있는 GIST에서 유일한 활성 치료 전략이므로(문헌 [Maki *et al.*, Oncologist 20(7) :823-30 (2015)]), 메닌 및 GIST 후성유전체의 다른 필수 구성요소를 표적으로 하는 것이 치료적으로 유리할 수 있다. GIST 종양 및 세포주에서 볼 수 있는 보존된 전사 및 인핸서 환경은, 질병-특이적 TF 및 인핸서 요소에 의해 조절되는 발암성 KIT 유전자 발현과 함께, 질병 조절의 후생적 메커니즘에 대한 이 질병의 의존성을 암시한다. 본원에 기술된 바와 같이, GIST 후성유전체 유지를 담당하는 공동 염색질 조절자 및 소분자 억제제(예: VIP-50469, EPZ-5676)로 여러 서로 다른 노드(node)에서 이들의 파괴가 어떻게 유망하고 선택적인 항암 활성을 나타내는지; 이들 억제제 클래스 각각의 구성원은 임상 시험에 도달한 상태이다(예: NCT04606446, NCT02141828). 염색질 조절자에 발암성 변화가 있는 백혈병과 비교할 때, 이러한 경로에 대한 의존성과 그 파괴에 대한 민감성 측면에서 GIST는 고형 종양 중에서 이례적인 결과일 수 있다.

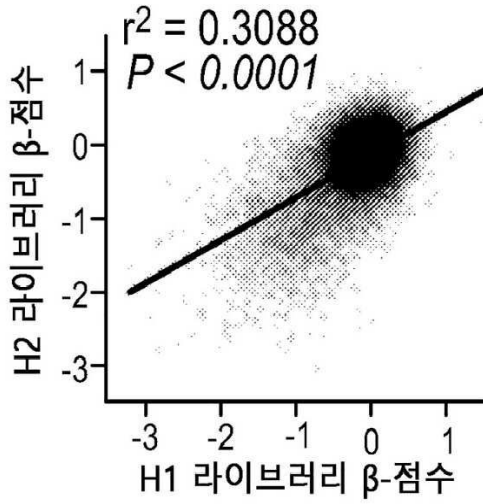
[0175] 모든 특허 간행물 및 비특허 간행물은 본 개시가 속하는 기술 분야의 당업자의 기술 수준을 나타낸다. 이러한 모든 간행물(참조된 특정 부분 포함)은 각각의 개별 간행물이 참조로 포함된 것으로 구체적이고 개별적으로 표시된 것과 동일한 정도로 참조로 본원에 포함된다.

[0176] 본원의 본 개시가 특정 구현예를 참조하여 설명되었더라도, 이들 구현예는 단지 본 발명의 원리 및 응용을 예시하는 것임을 이해해야 한다. 따라서, 다음의 청구범위에 의해 정의되는 본 개시의 사상 및 범위를 벗어나지 않

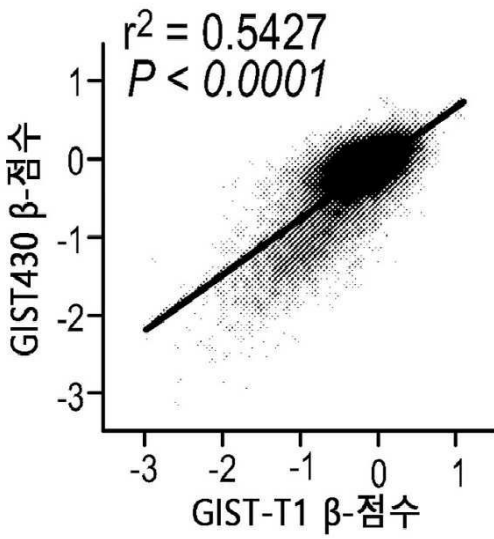
으면서 예시적인 구현예에 대해 수많은 수정이 이루어질 수 있고, 다른 배열이 고안될 수 있음을 이해해야 한다.

도면

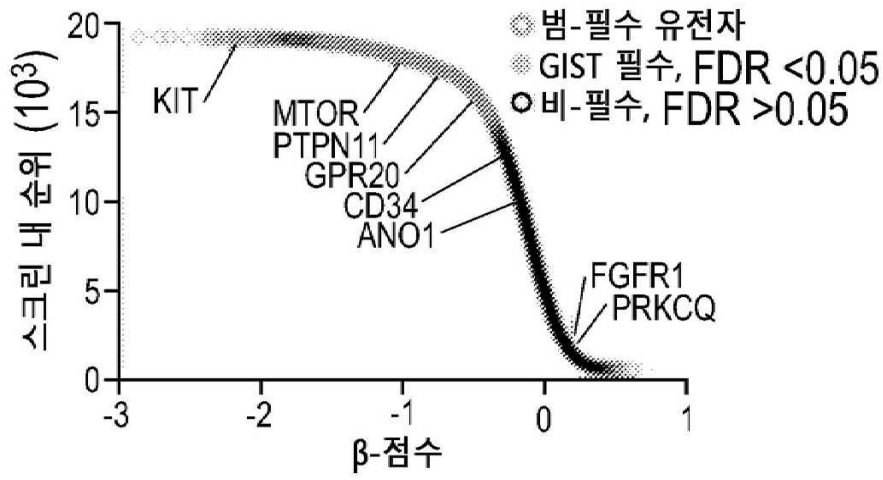
도면1a



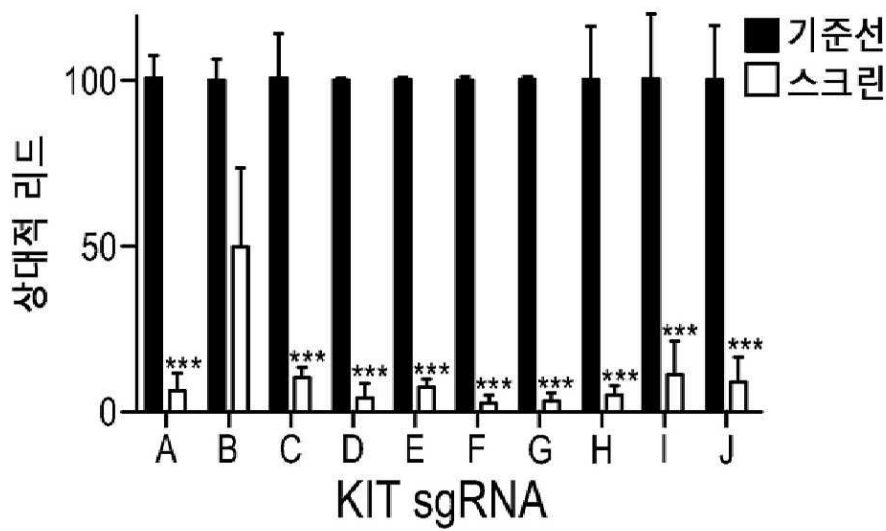
도면1b



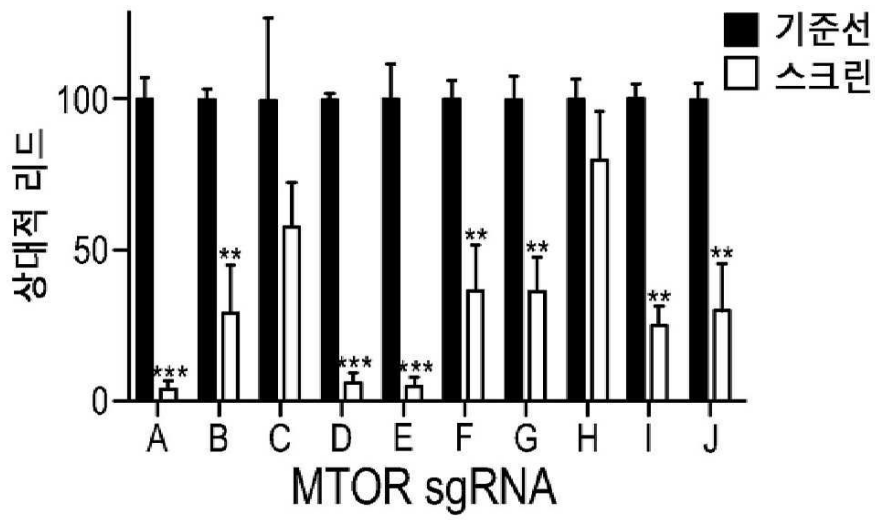
도면1c



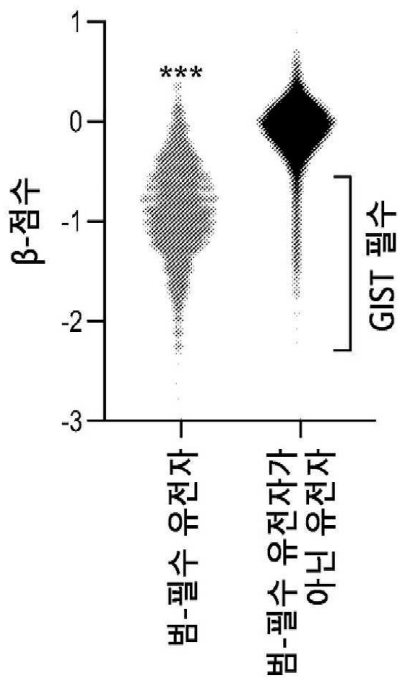
도면1d



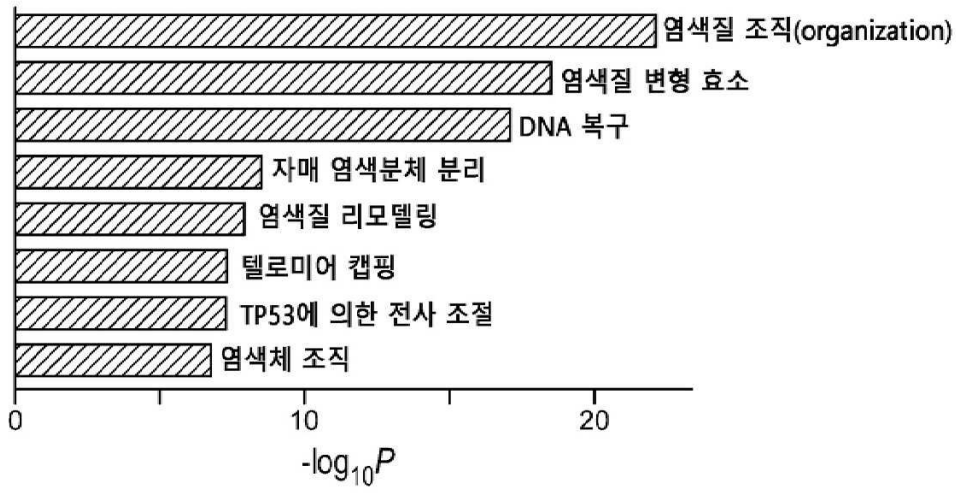
도면1e



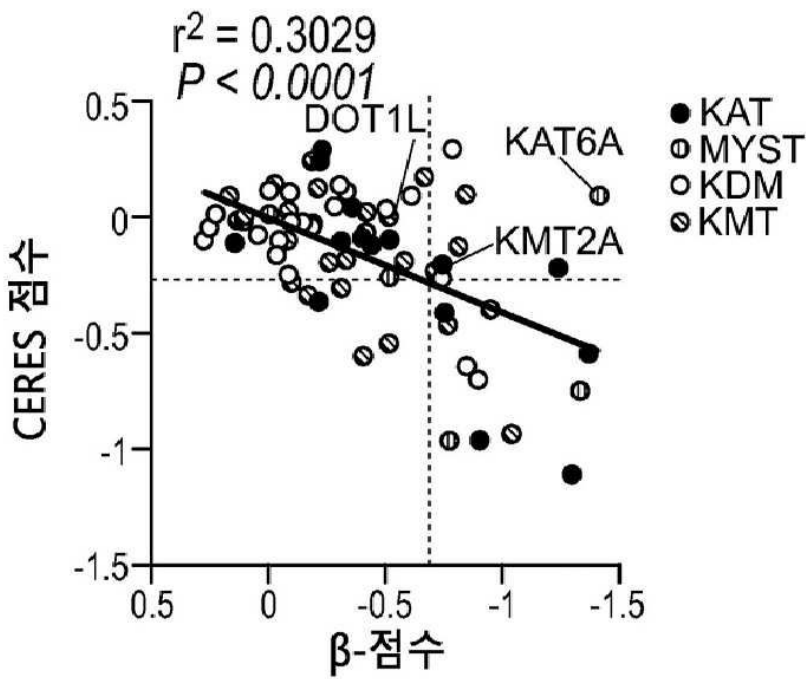
도면1f



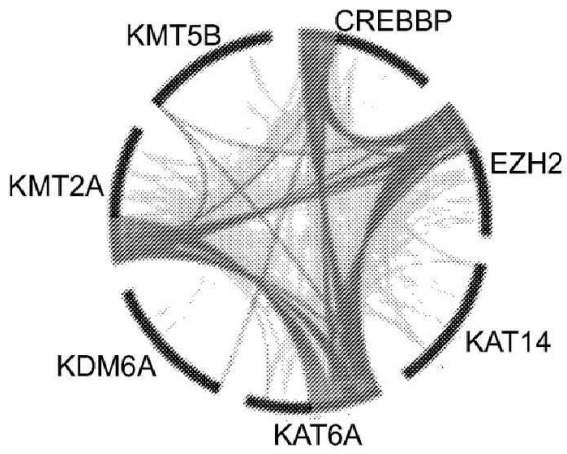
도면1g



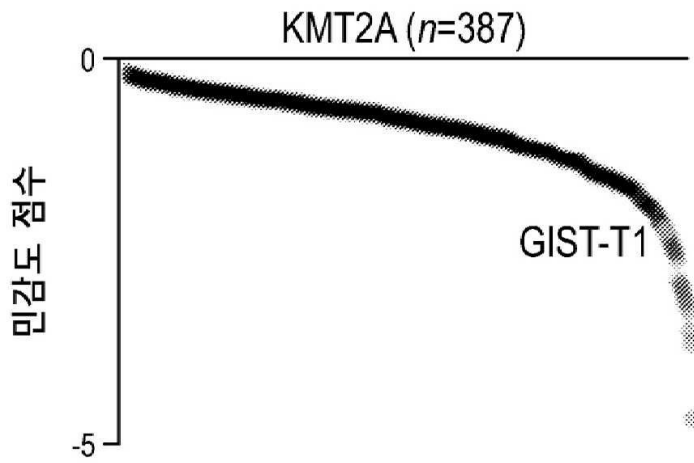
도면2a



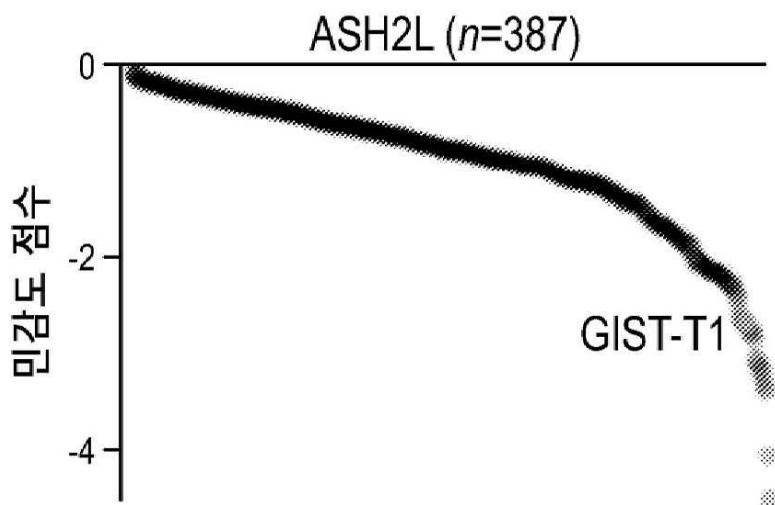
도면2b



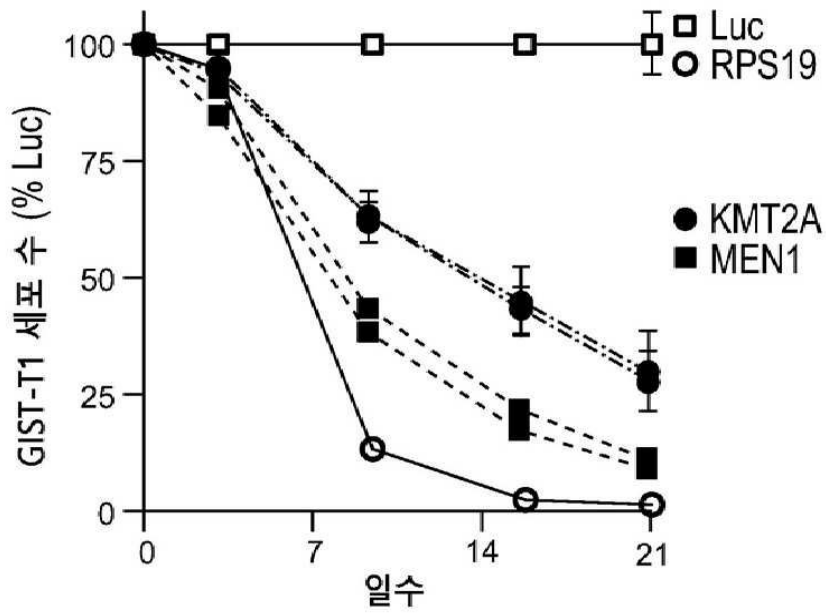
도면2c



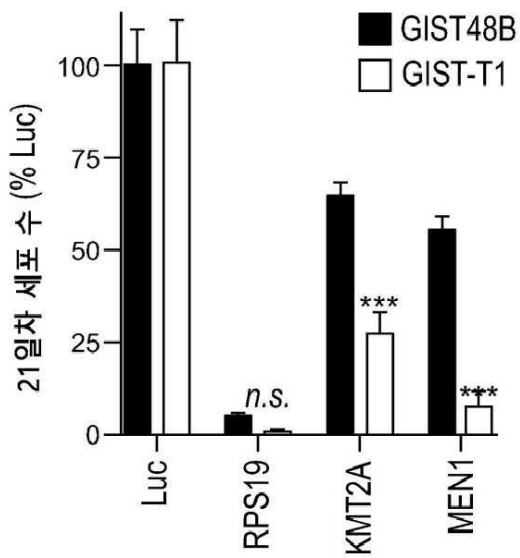
도면2d



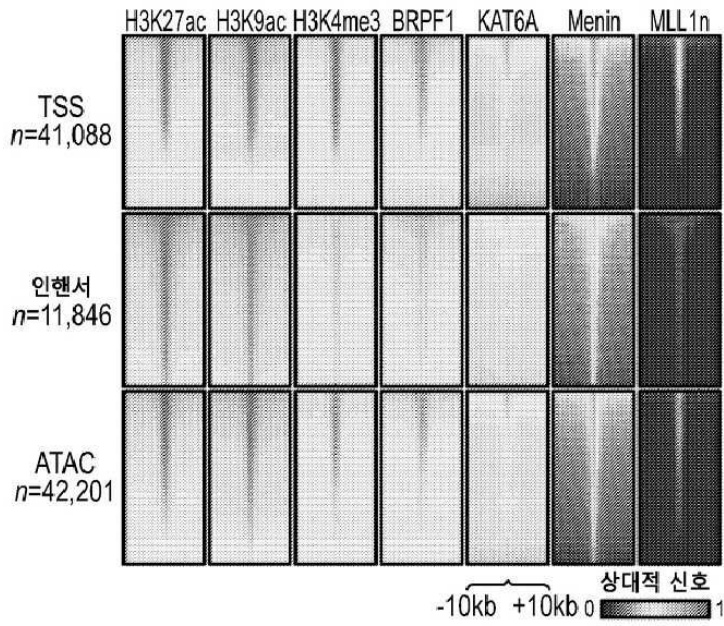
도면2e



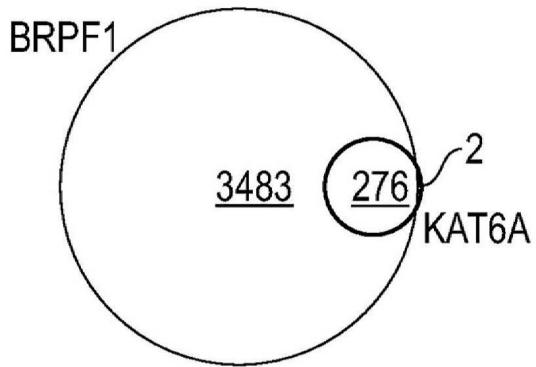
도면2f



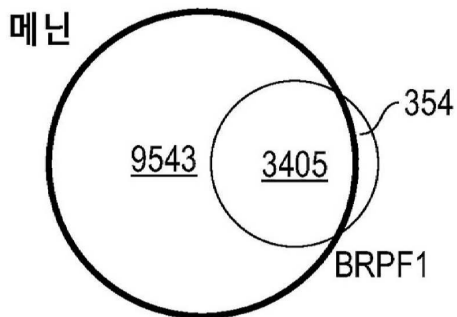
도면3a



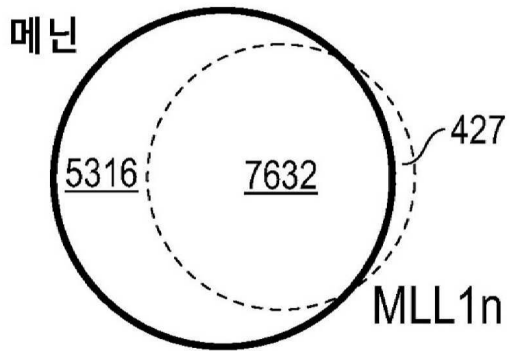
도면3b



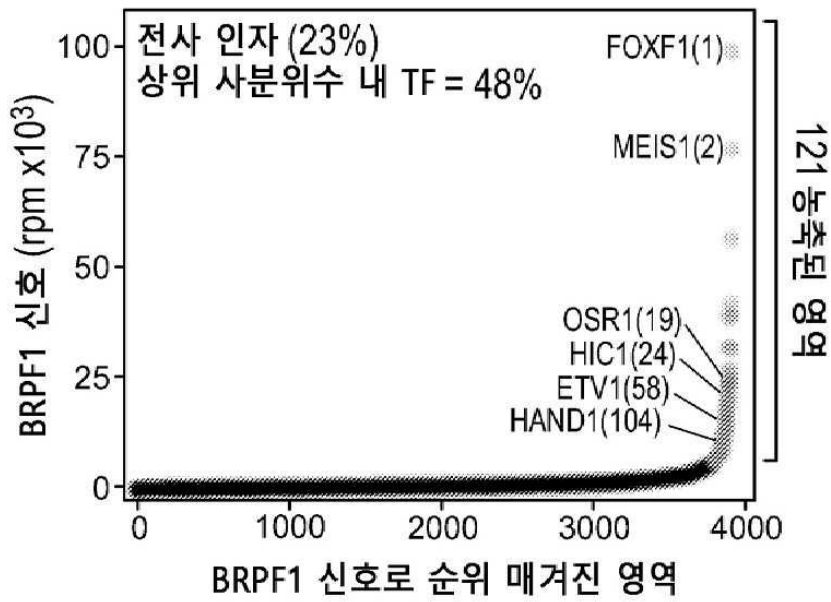
도면3c



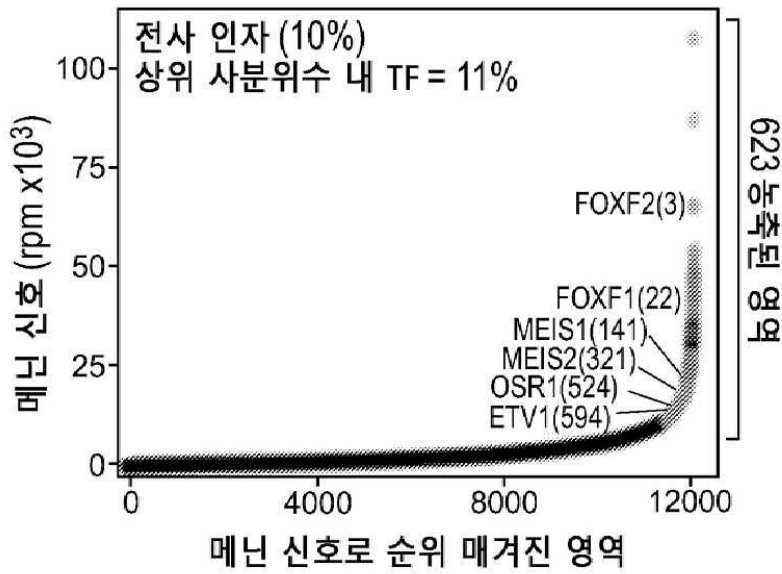
도면3d



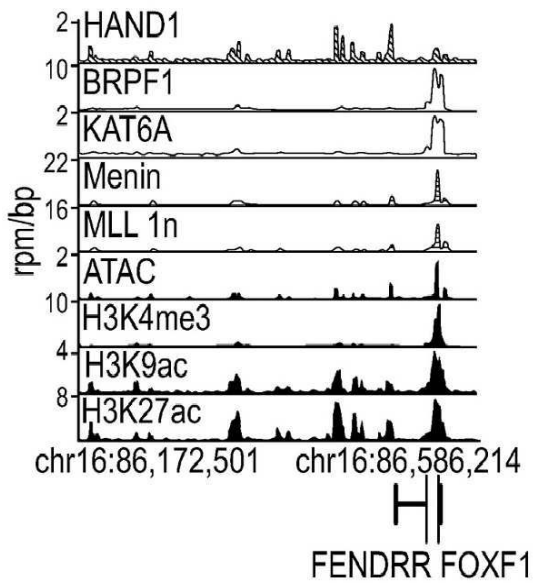
도면3e



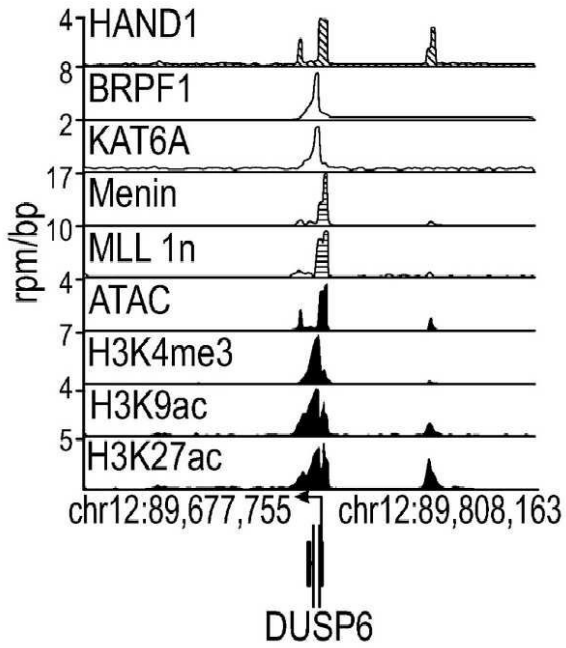
도면3f



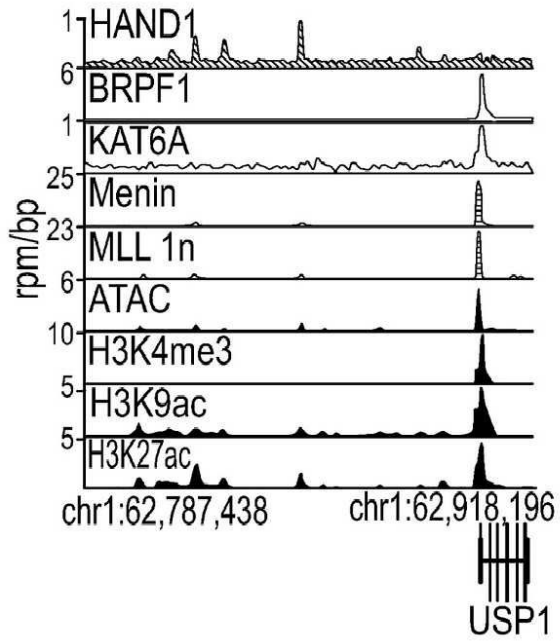
도면3g



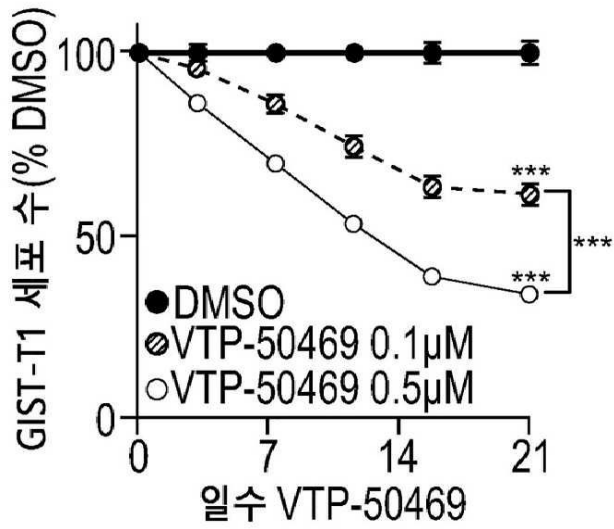
도면3h



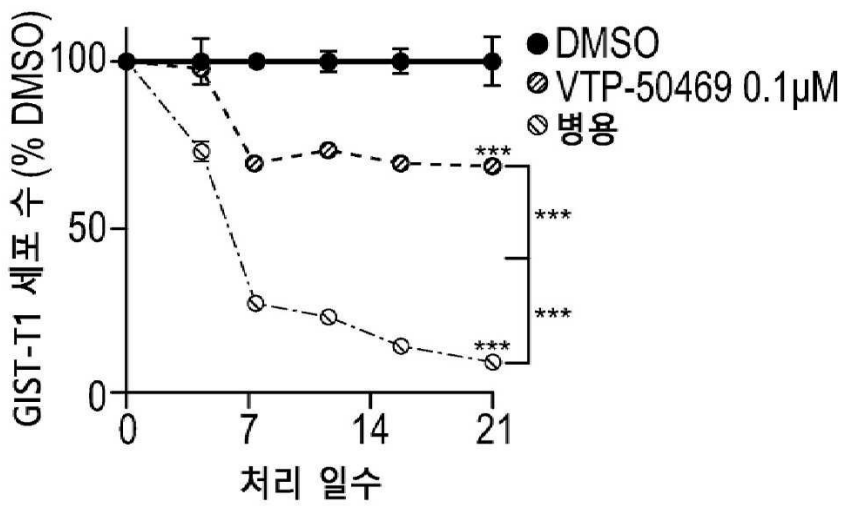
도면3i



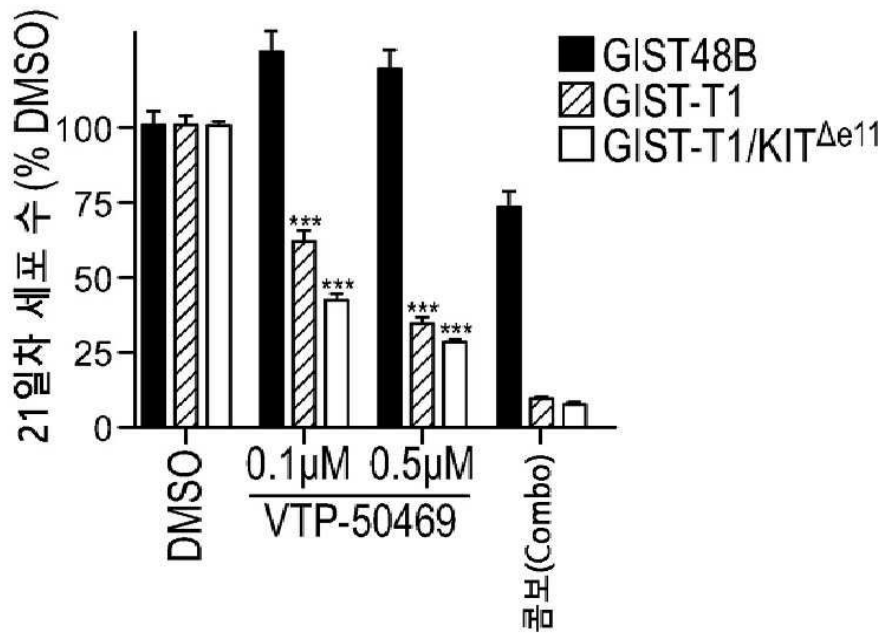
도면4a



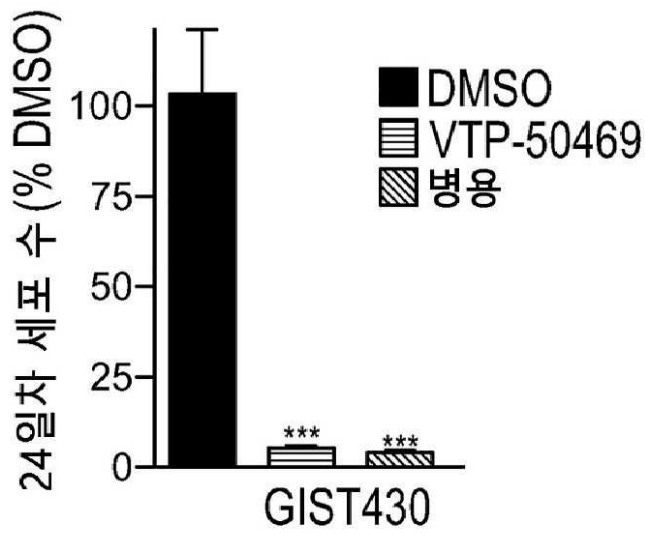
도면4b



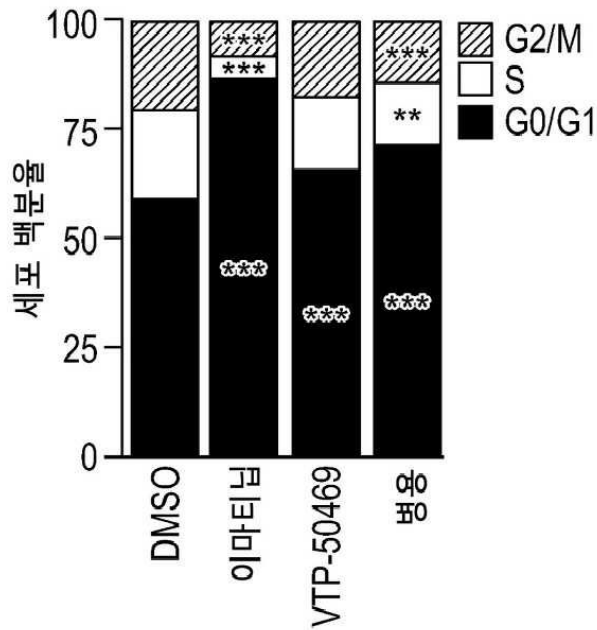
도면4c



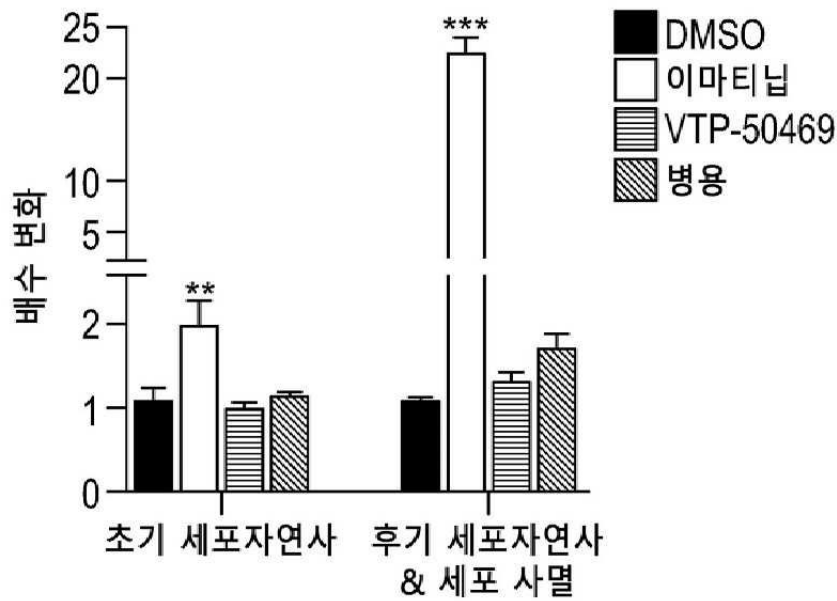
도면4d



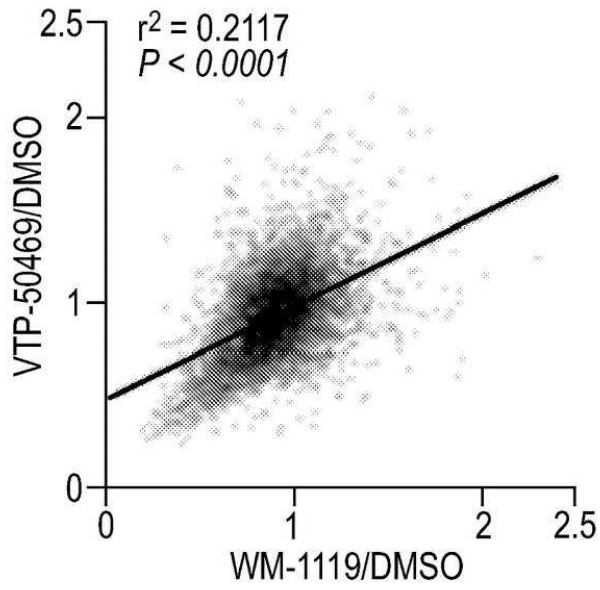
도면4e



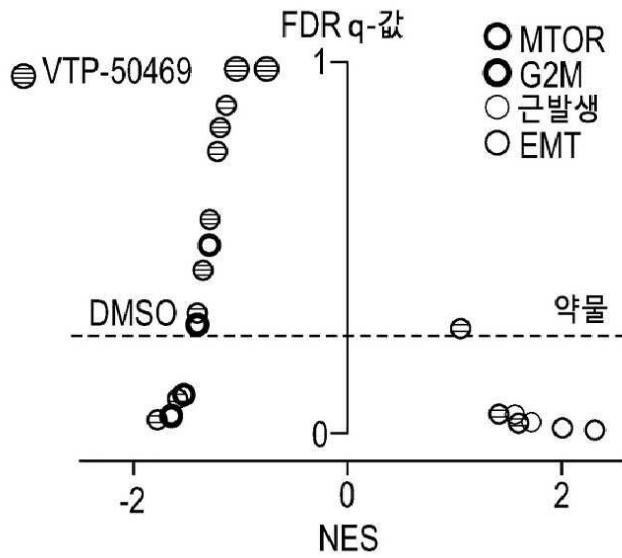
도면4f



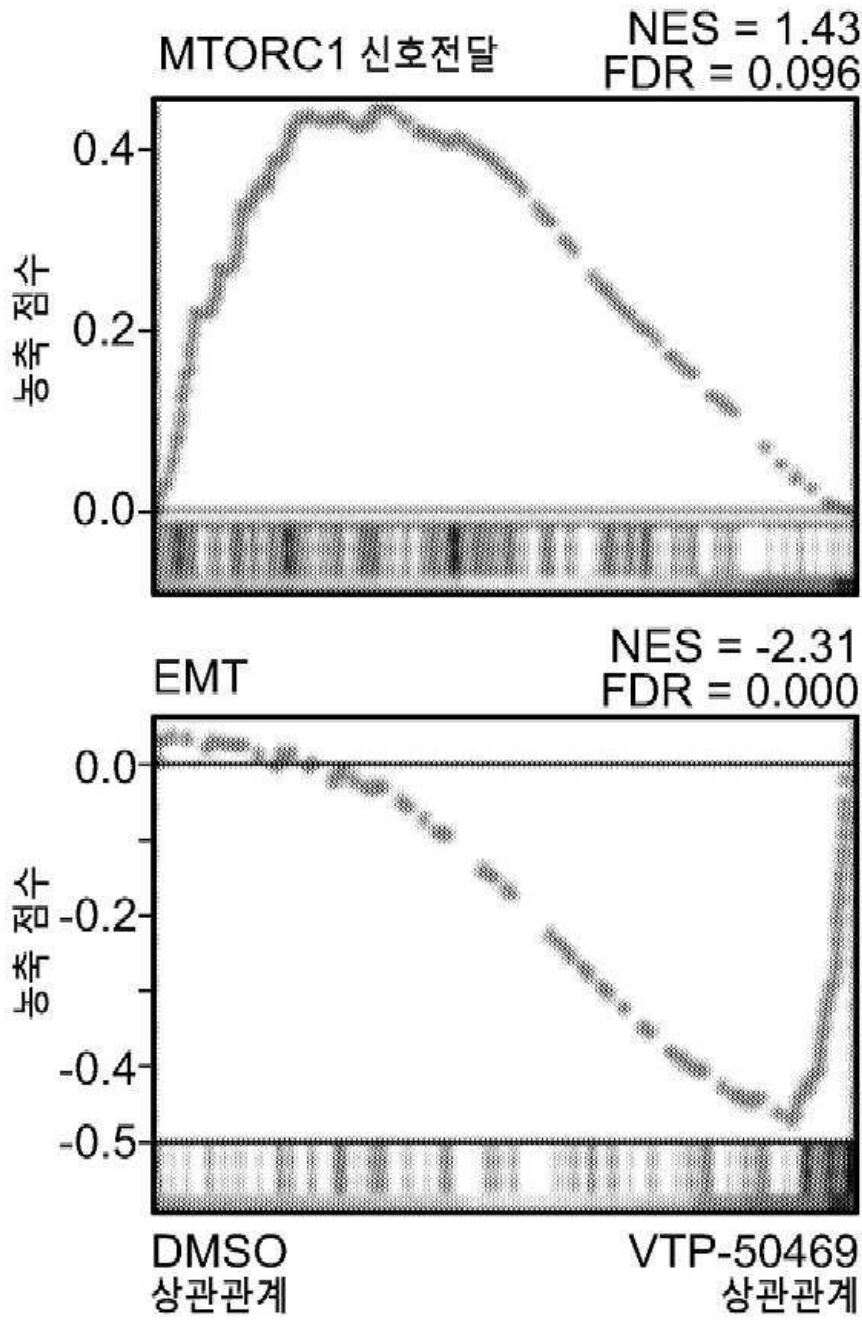
도면5a



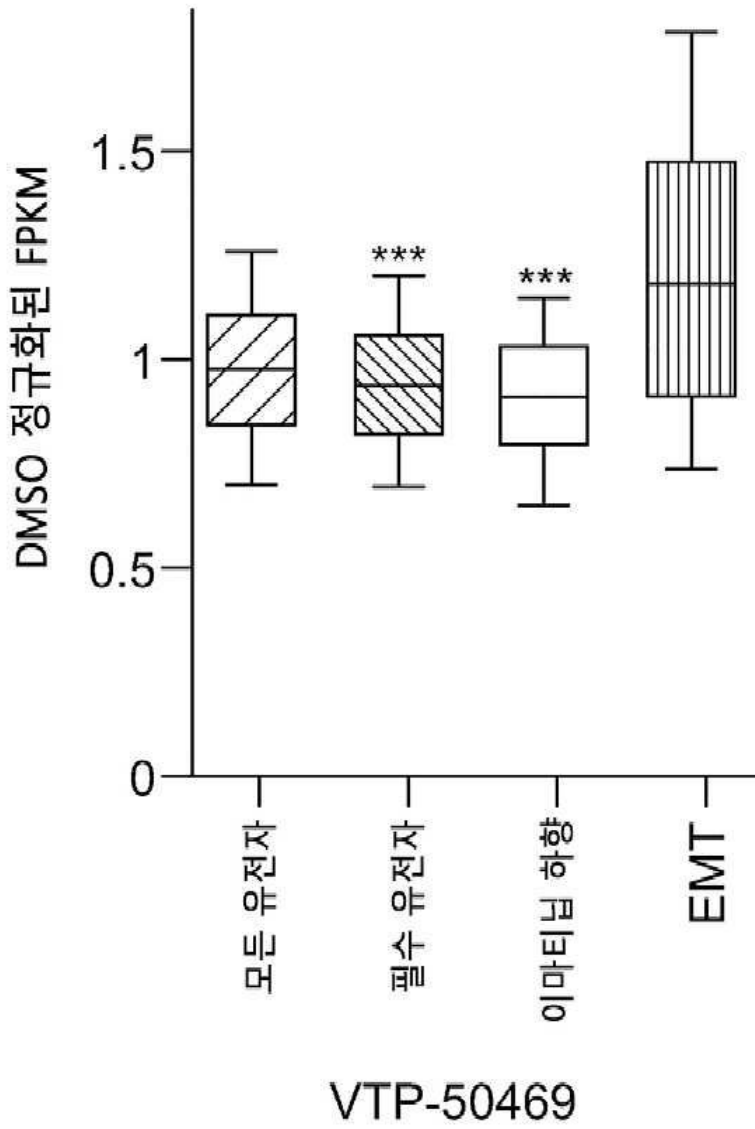
도면5b



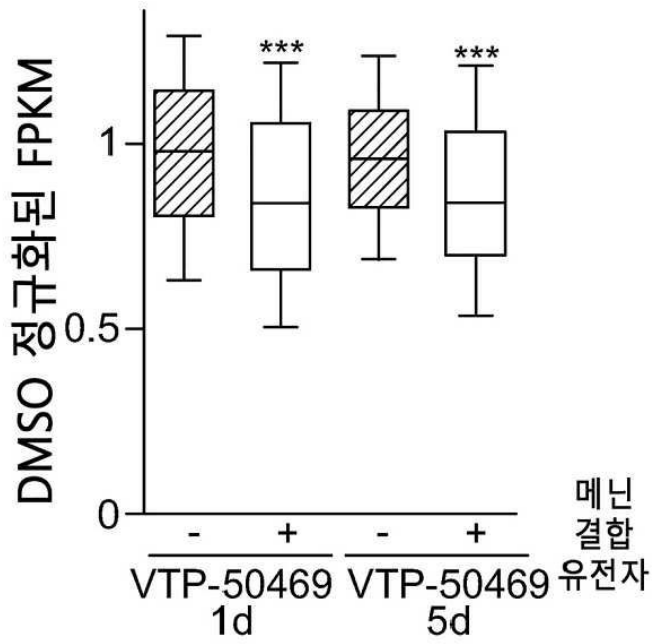
도면5c



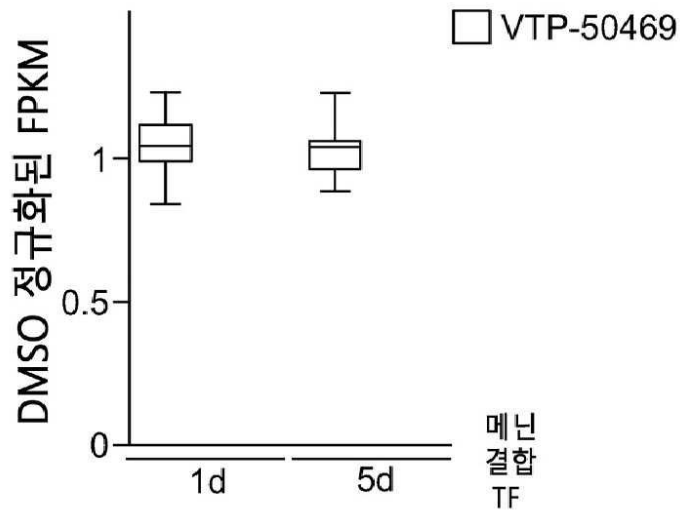
도면5d



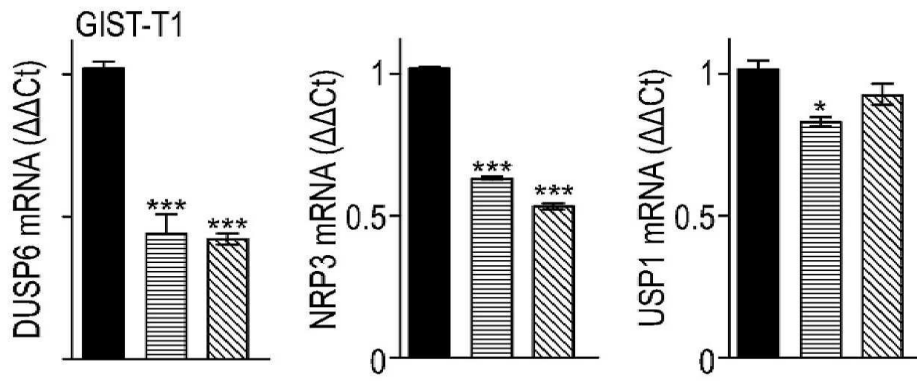
도면5e



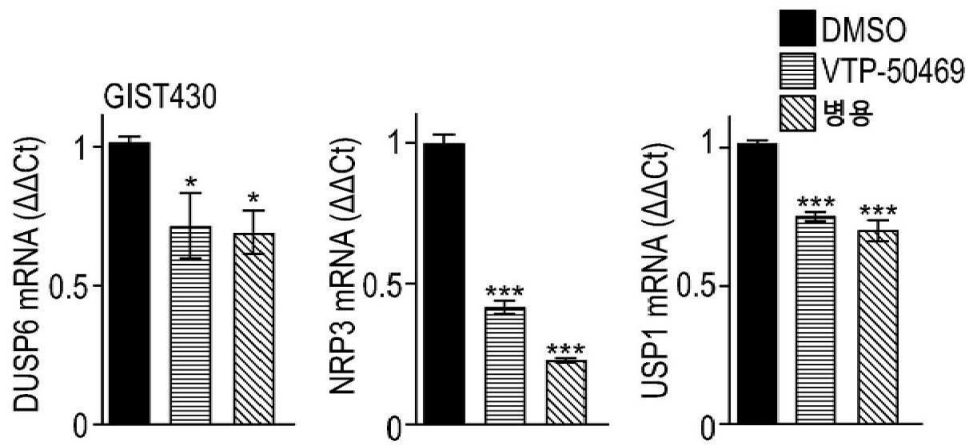
도면5f



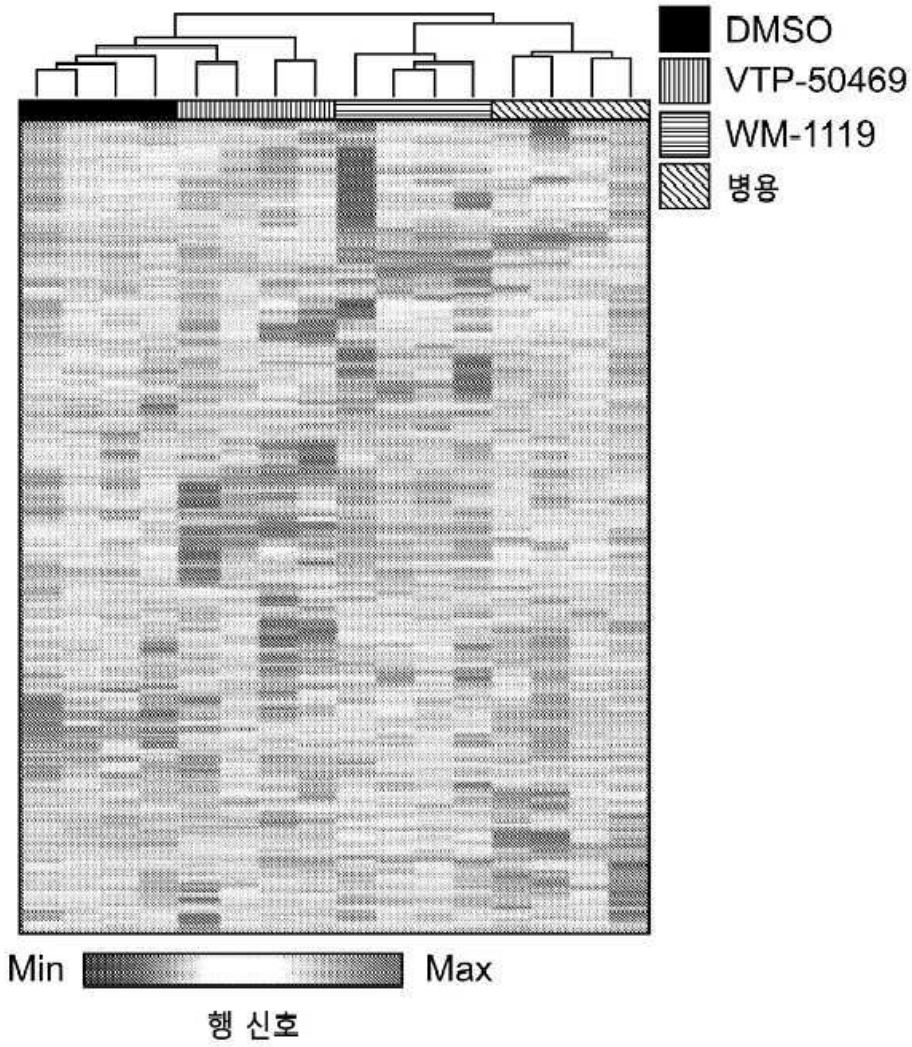
도면5g



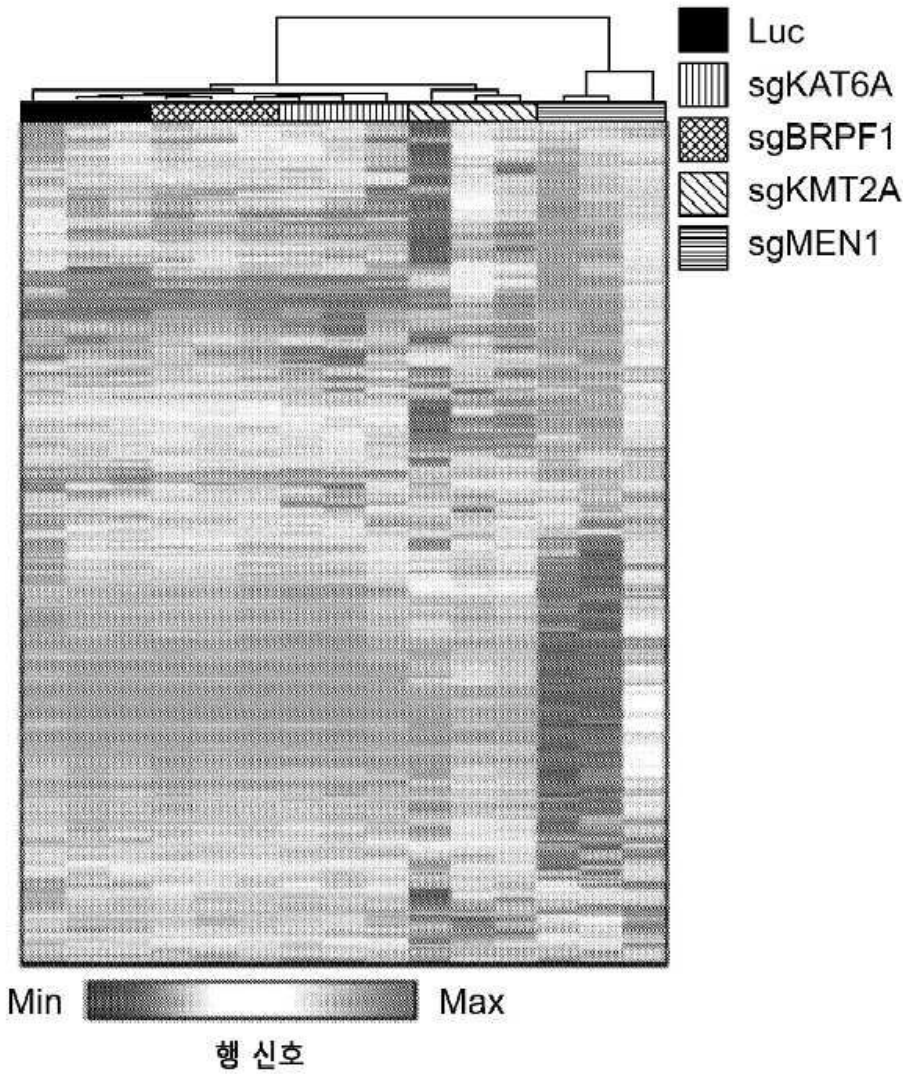
도면5h



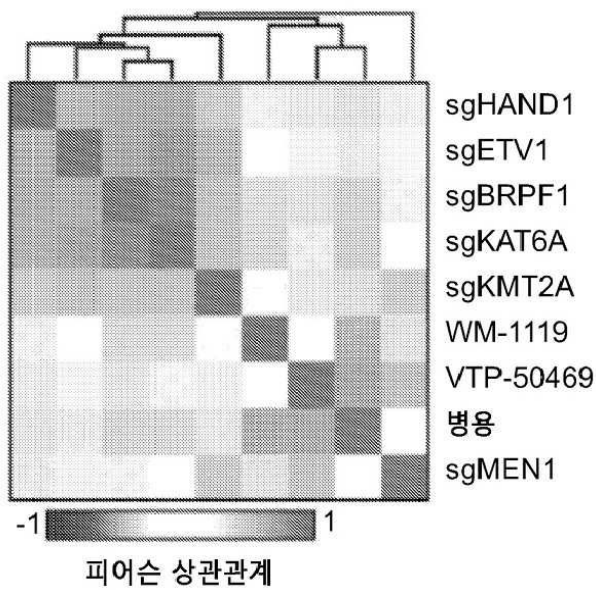
도면5i



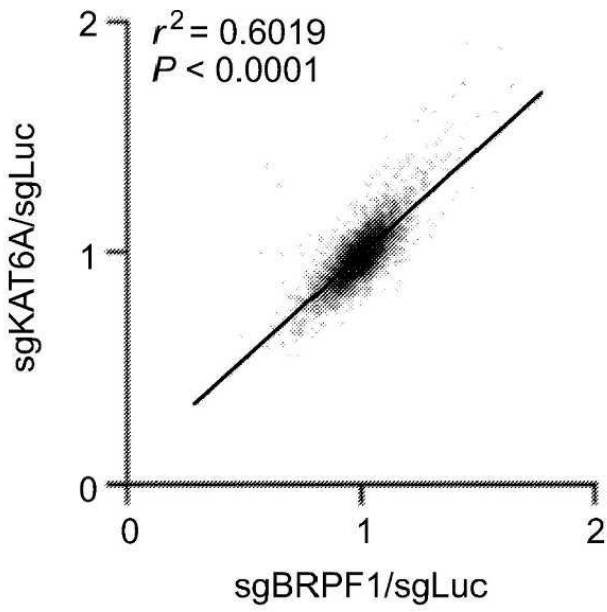
도면5j



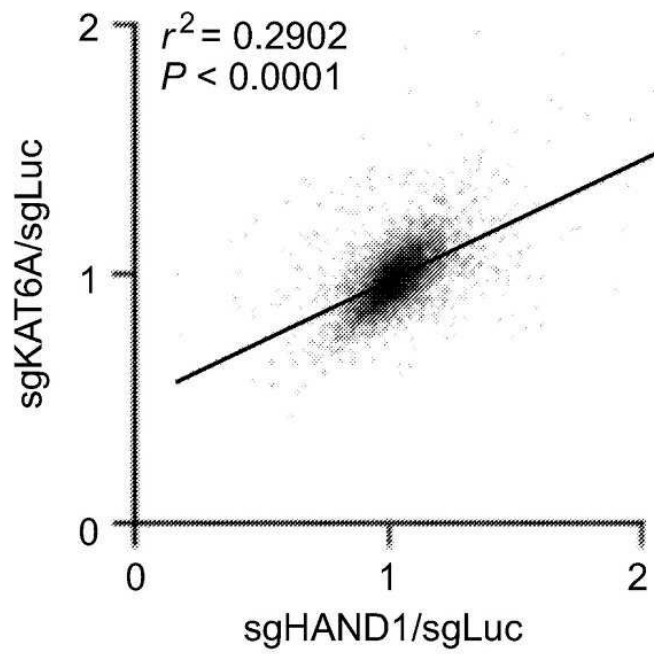
도면5k



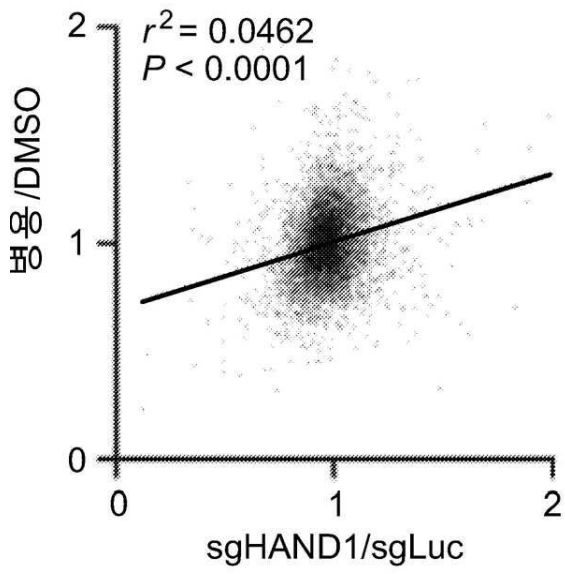
도면5l



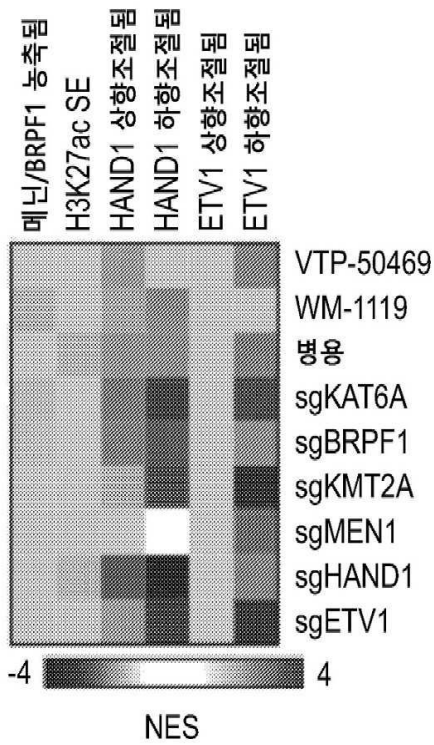
도면5m



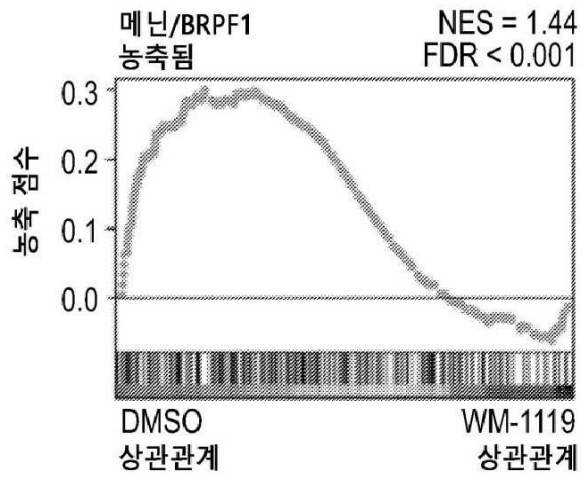
도면5n



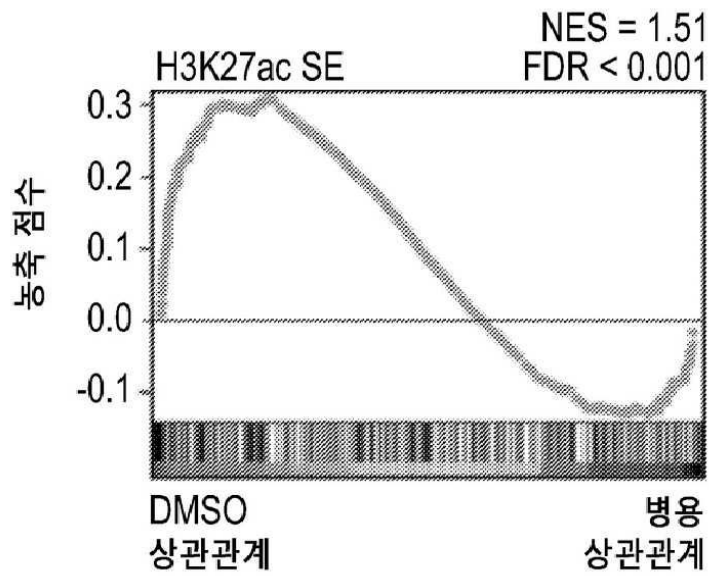
도면5o



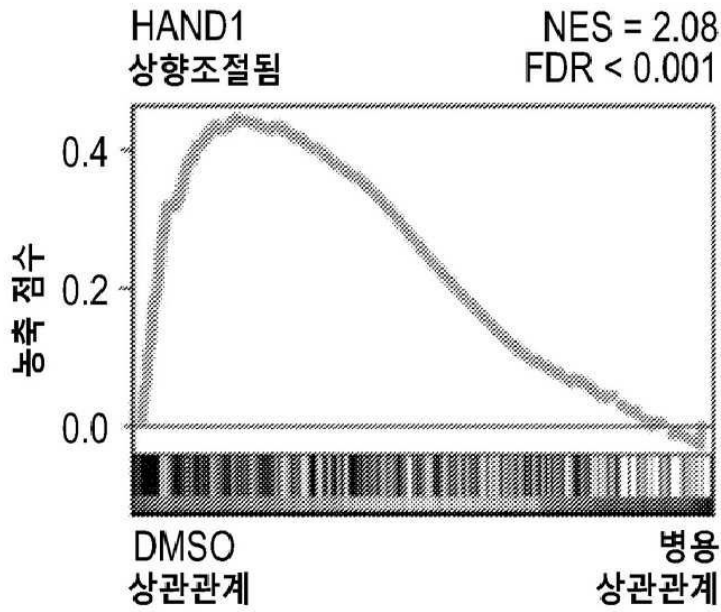
도면5p



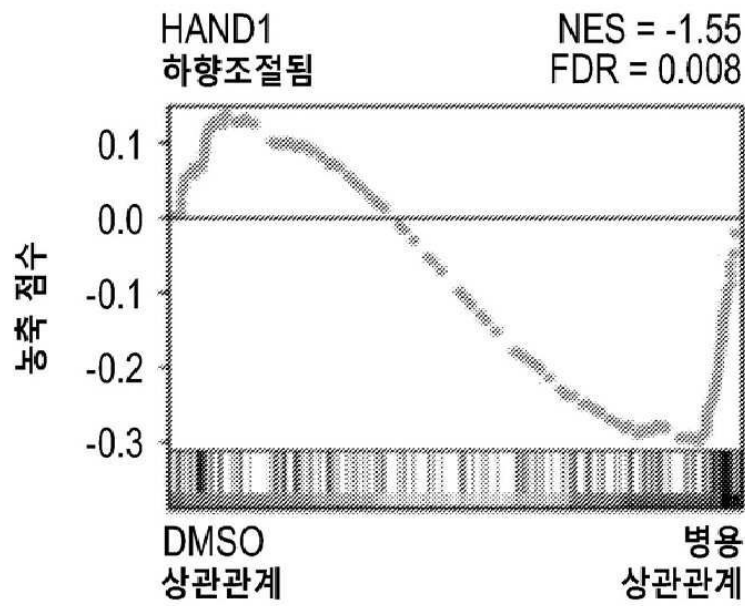
도면5q



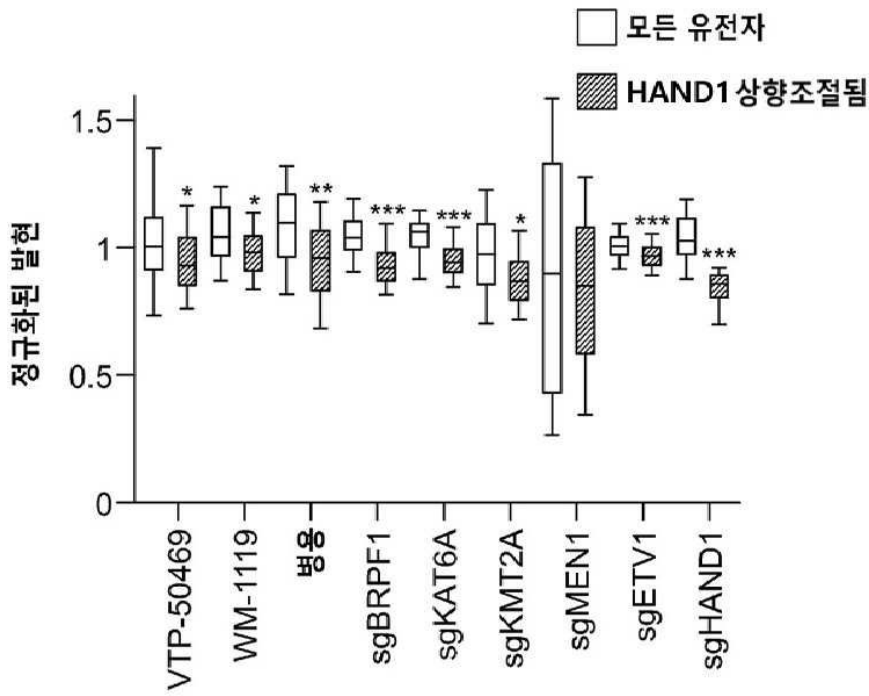
도면5r



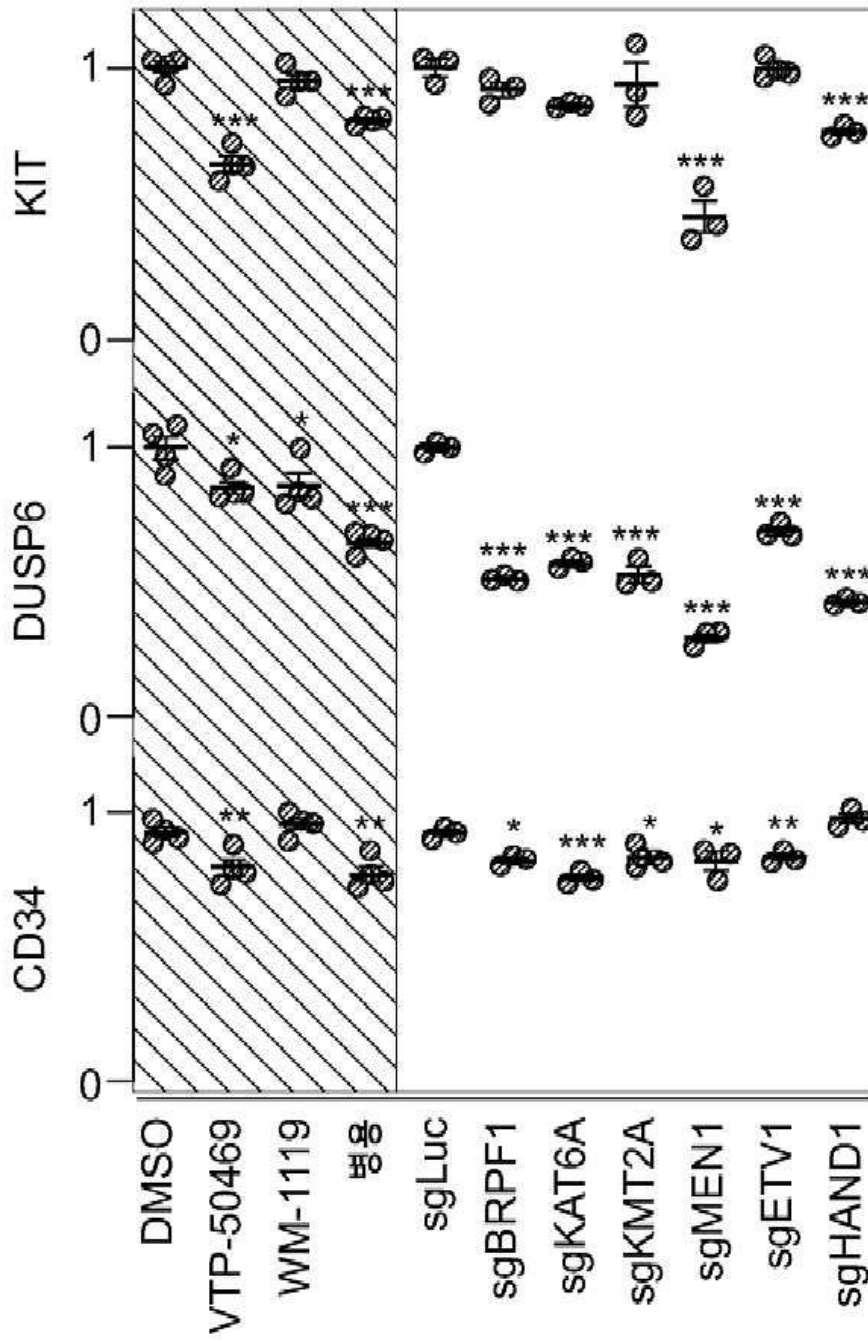
도면5s



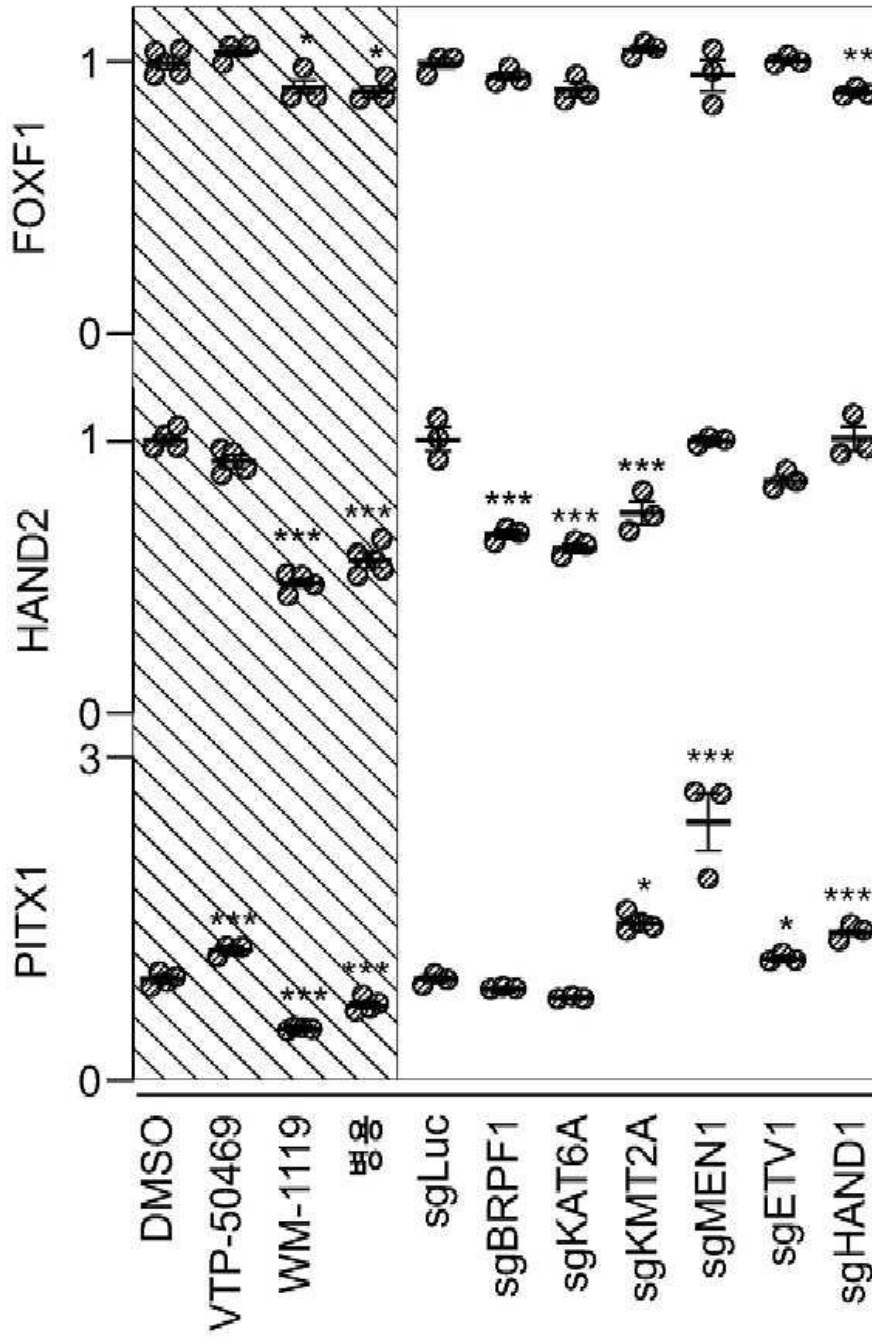
도면5t



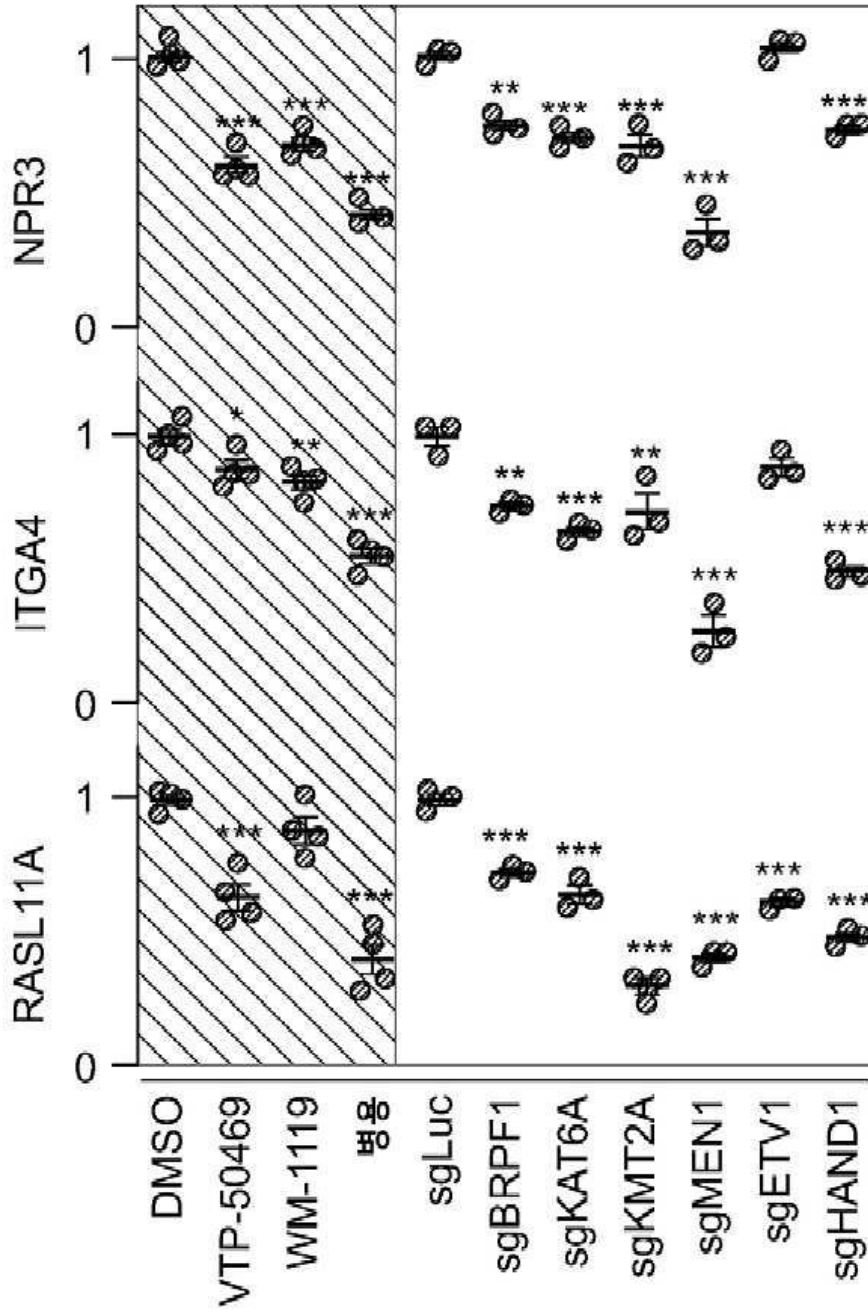
도면5u



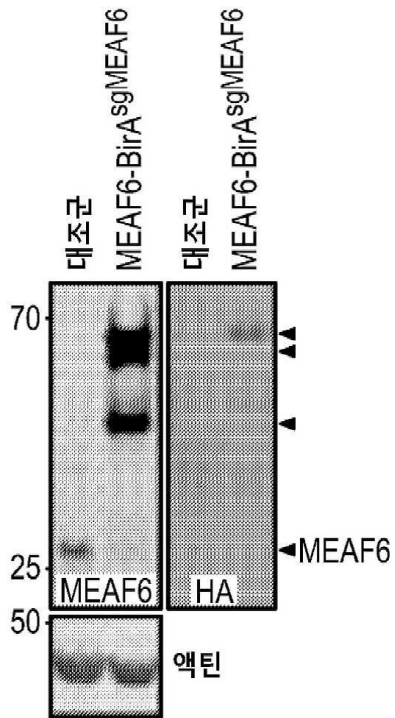
도면5v



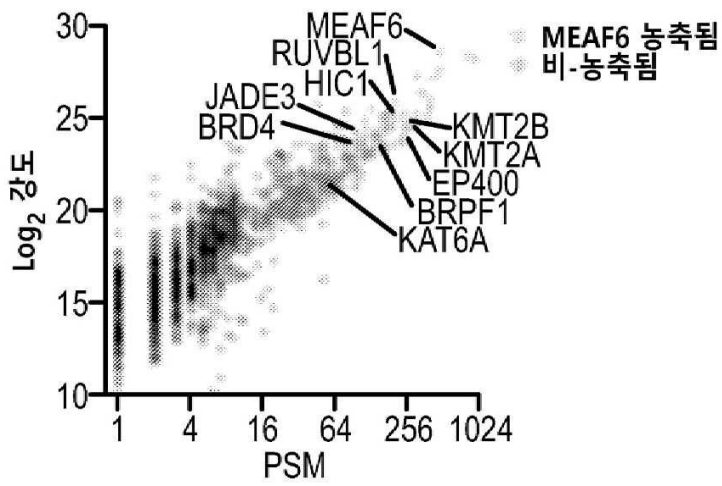
도면5w



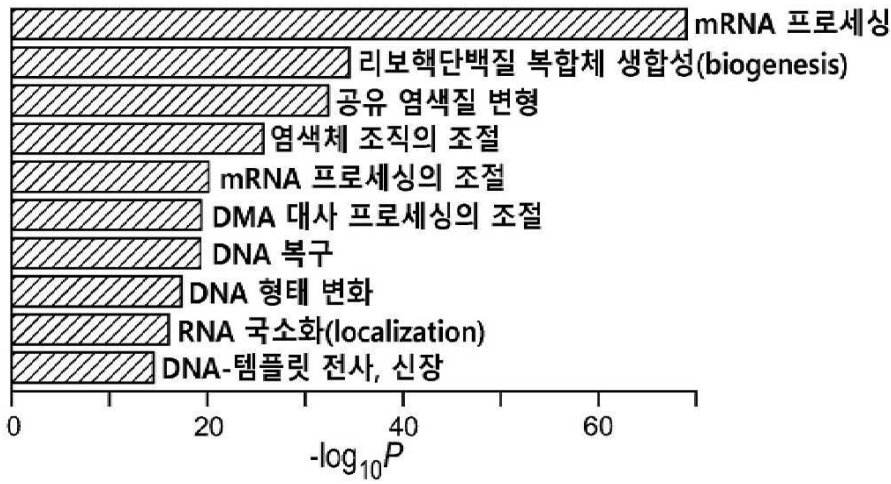
도면6a



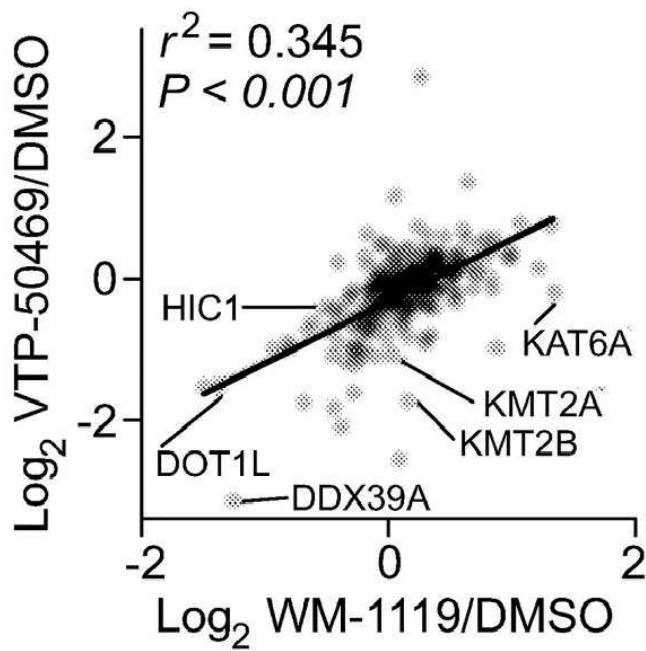
도면6b



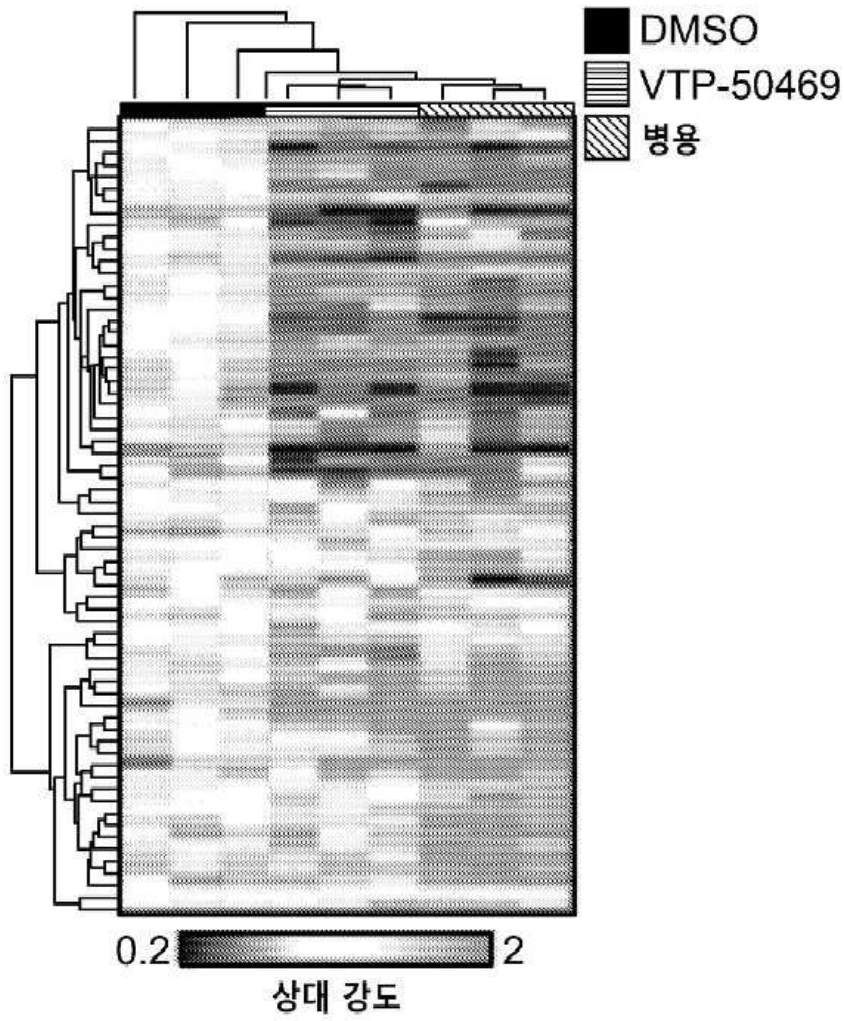
도면6c



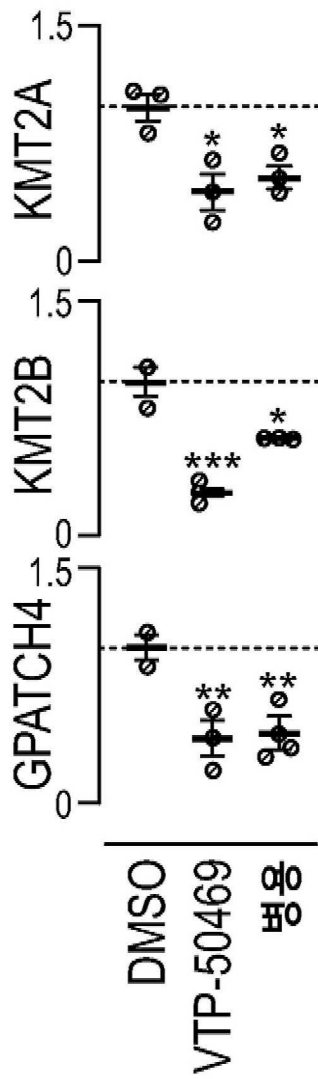
도면6d



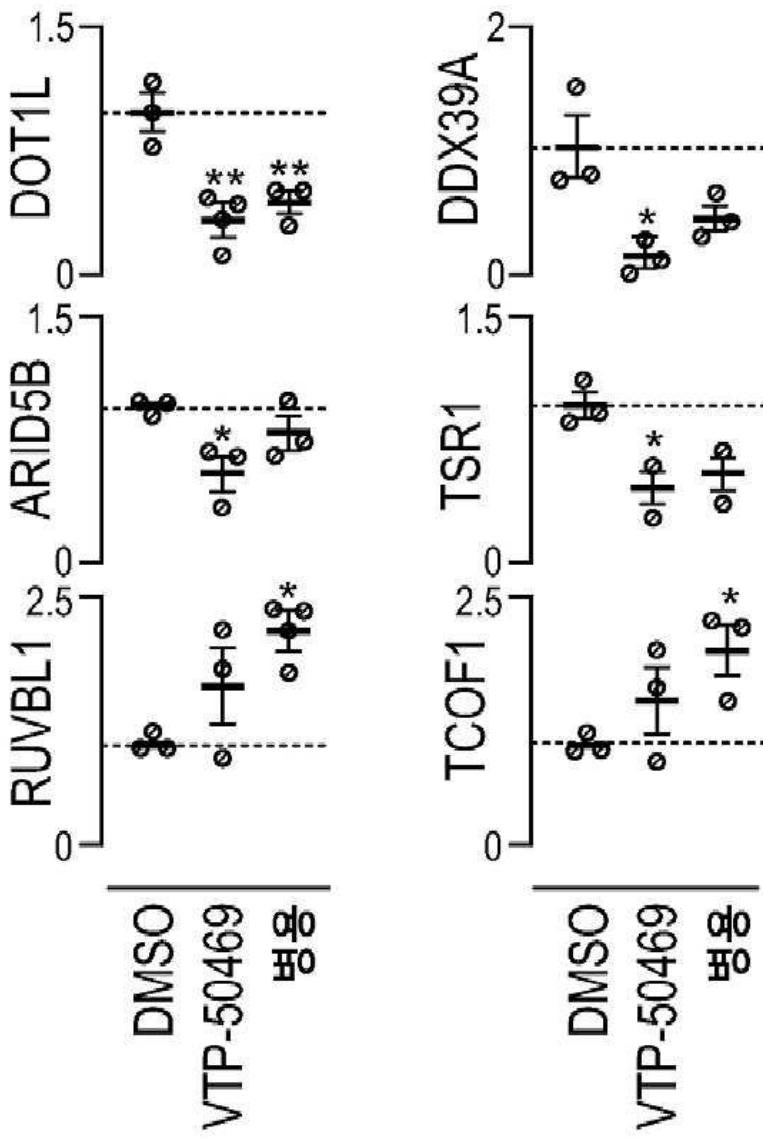
도면6e



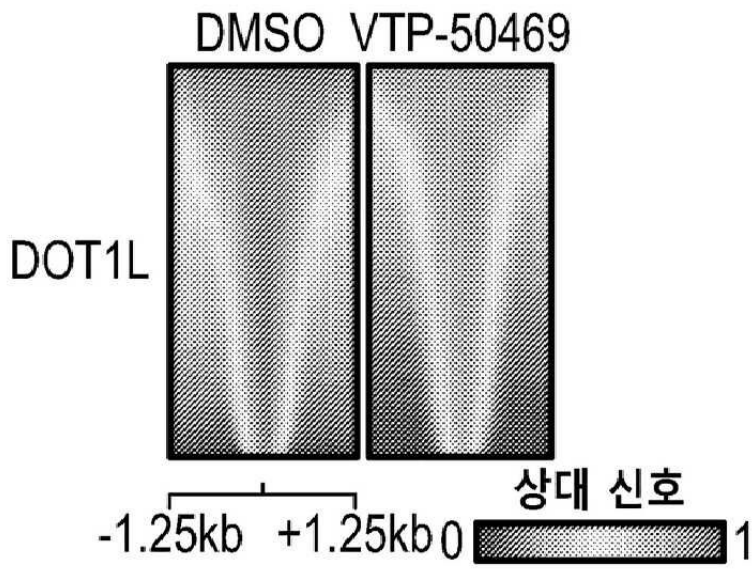
도면6f



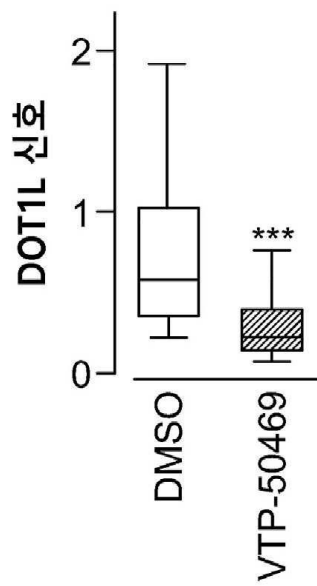
도면6g



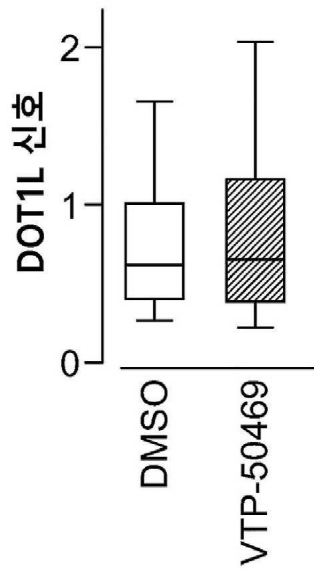
도면6h



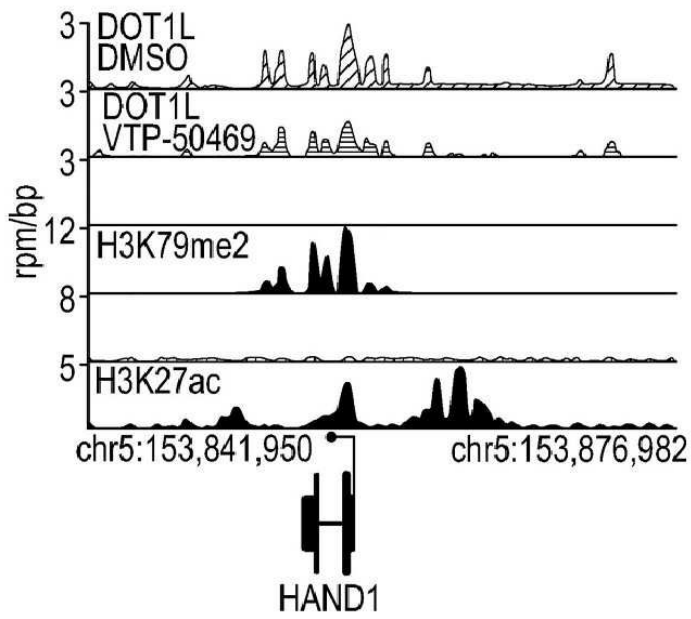
도면6i



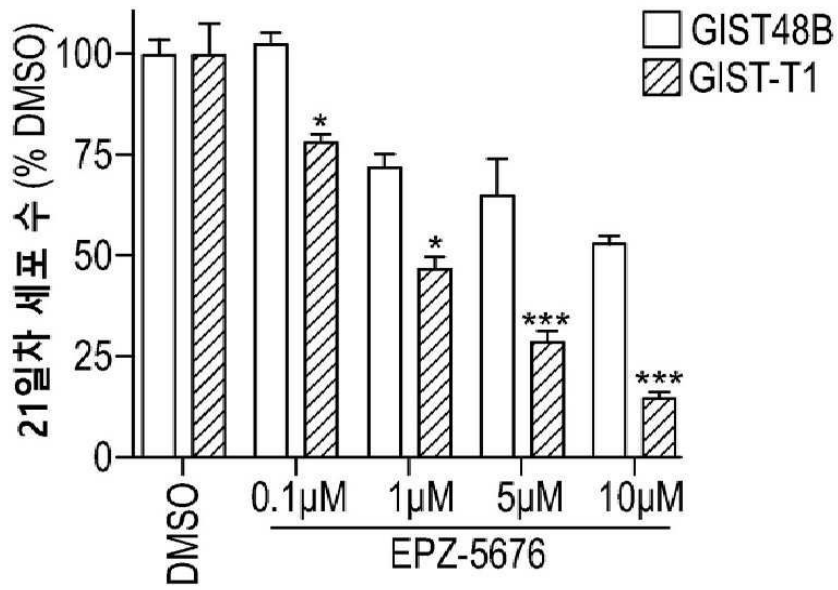
도면6j



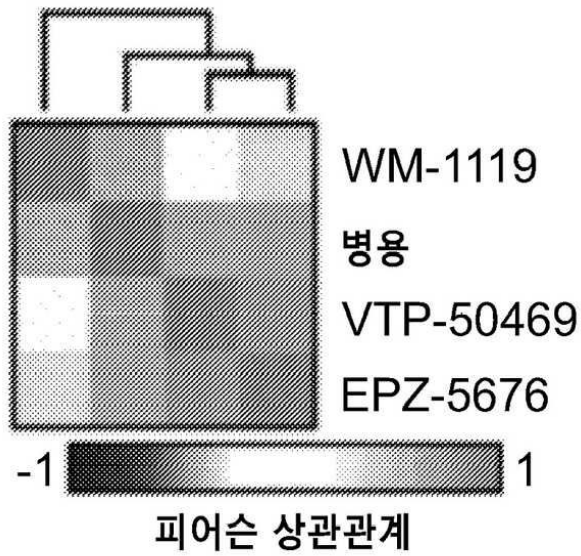
도면6k



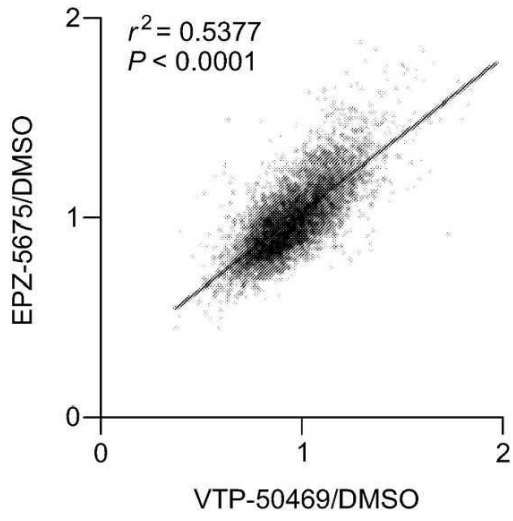
도면6l



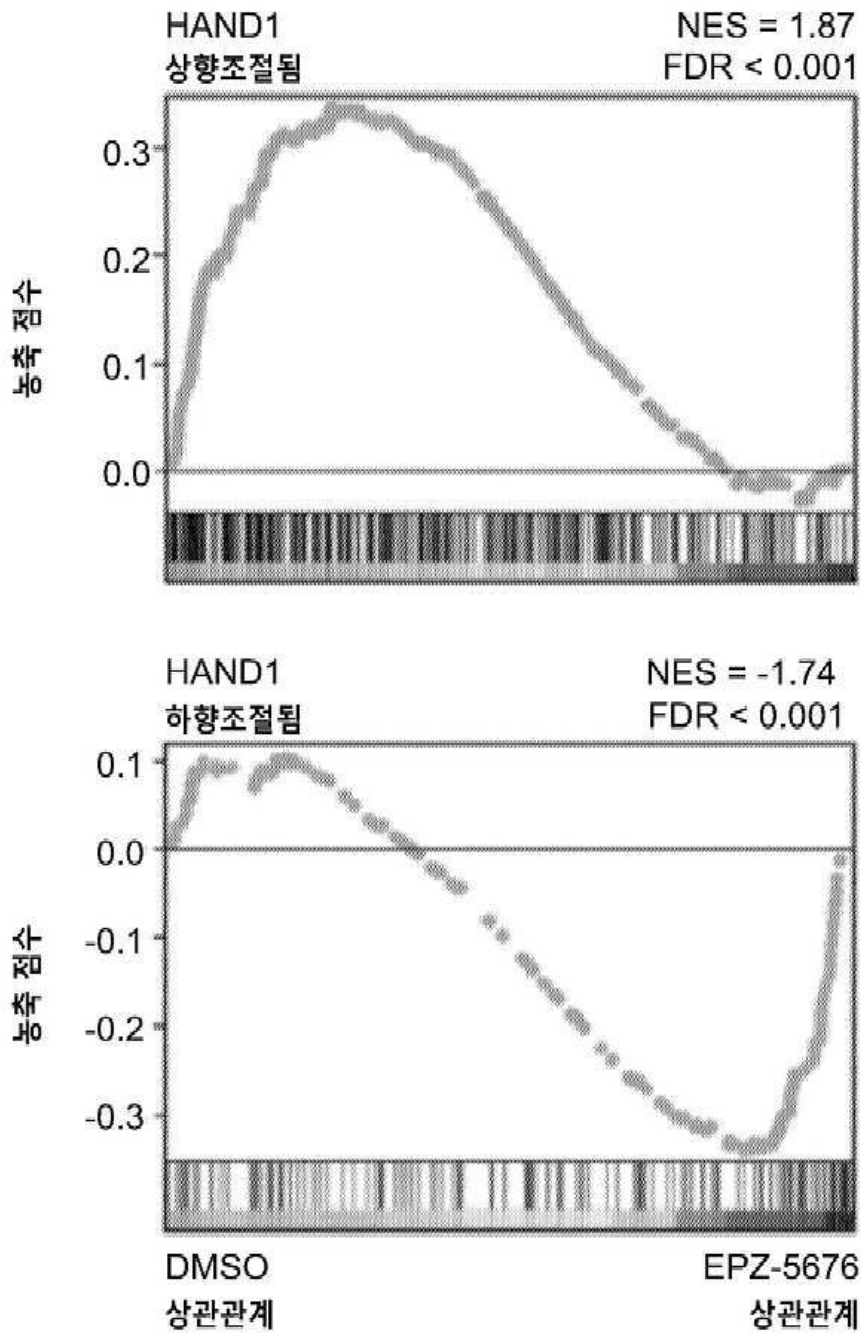
도면6m



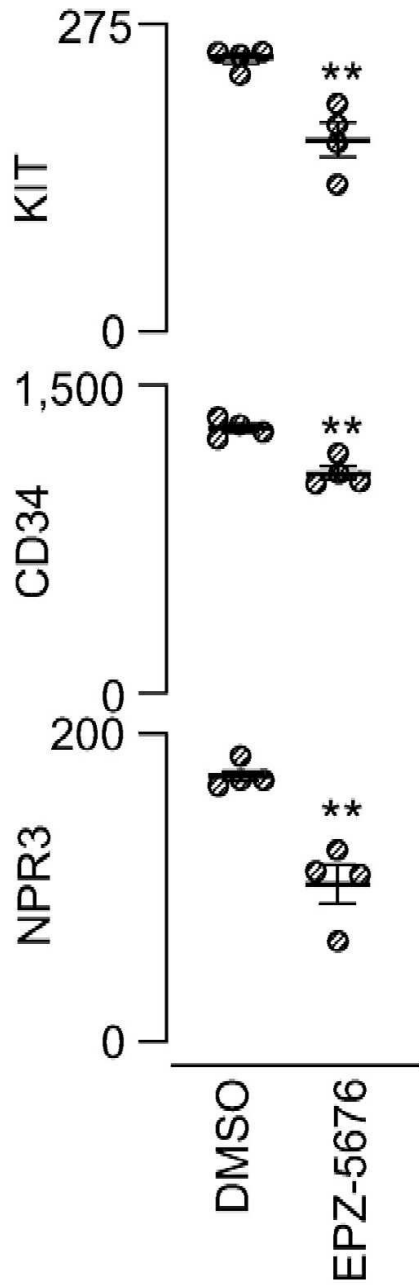
도면6n



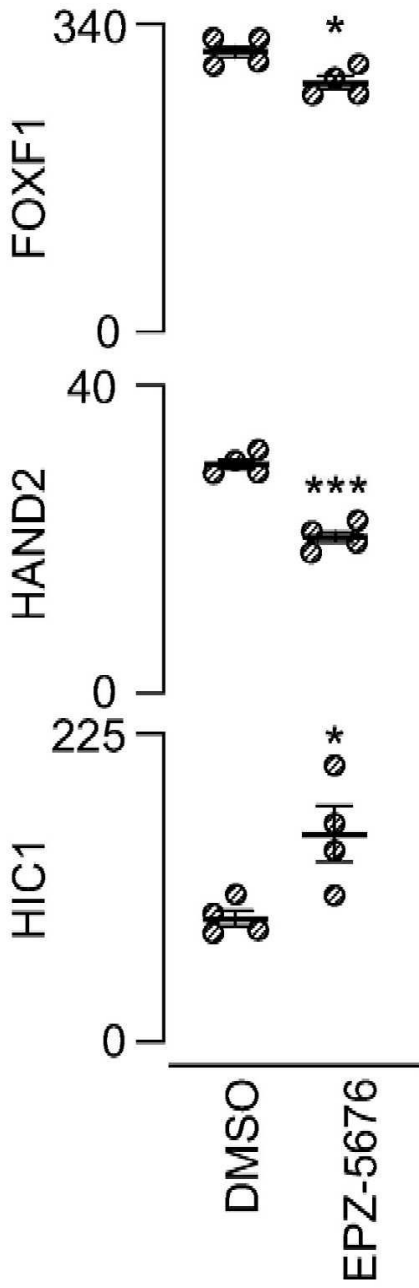
도면60



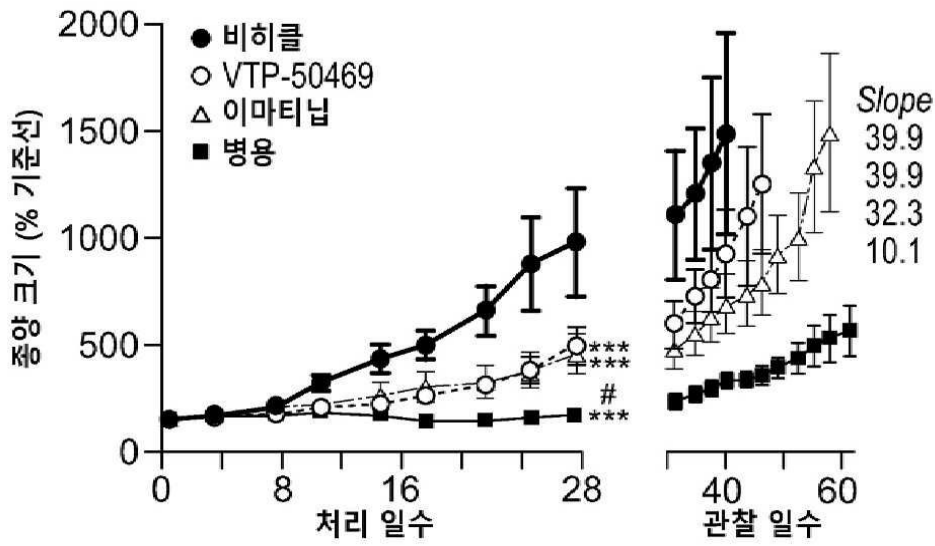
도면6p



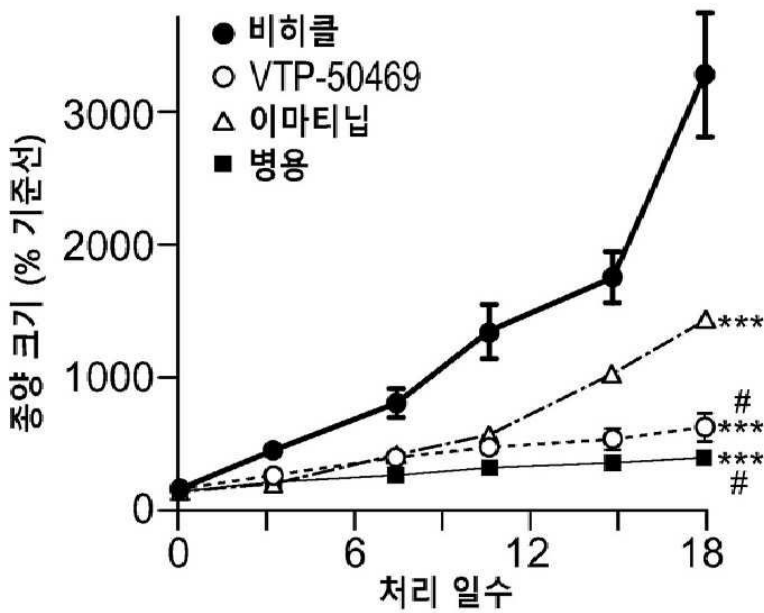
도면6q



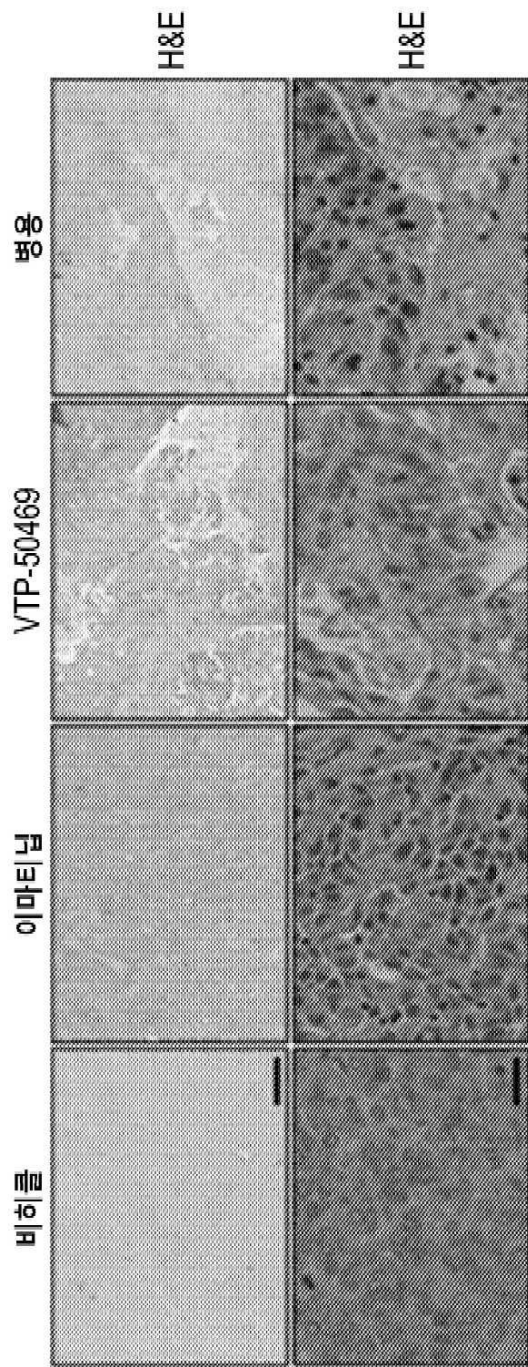
도면7a



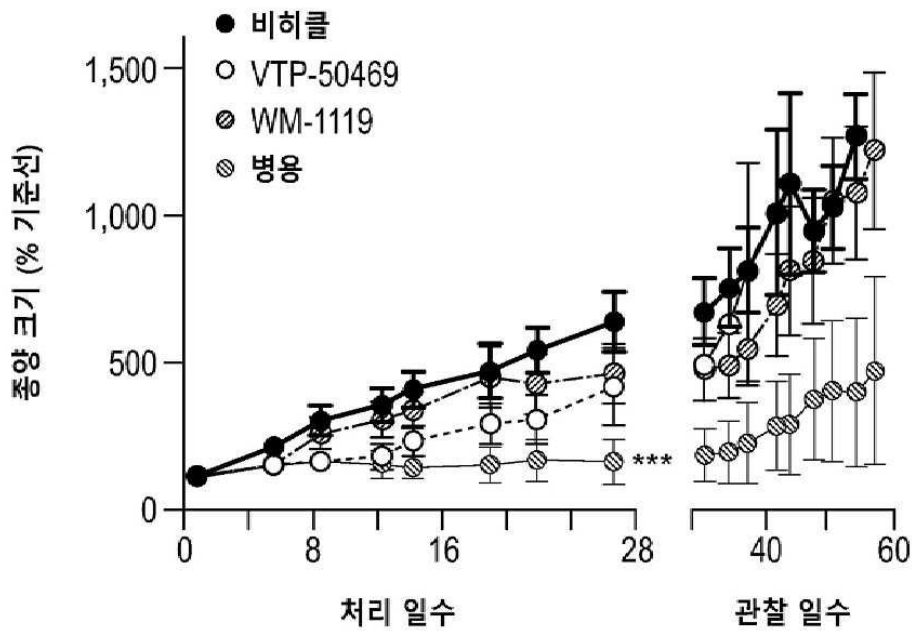
도면7b



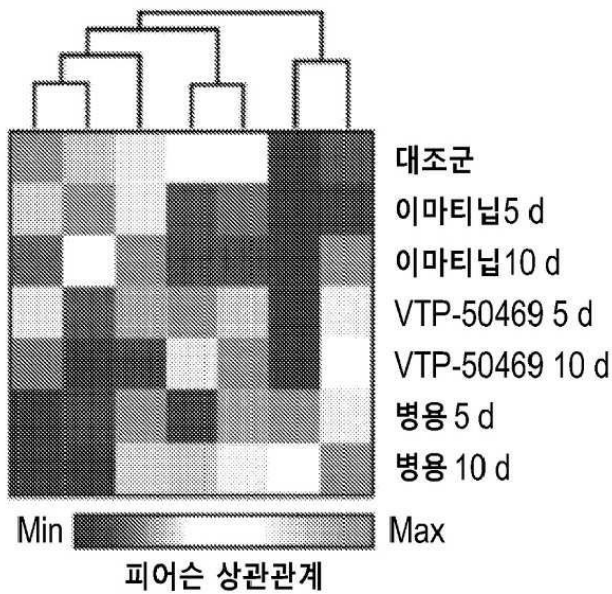
도면7c



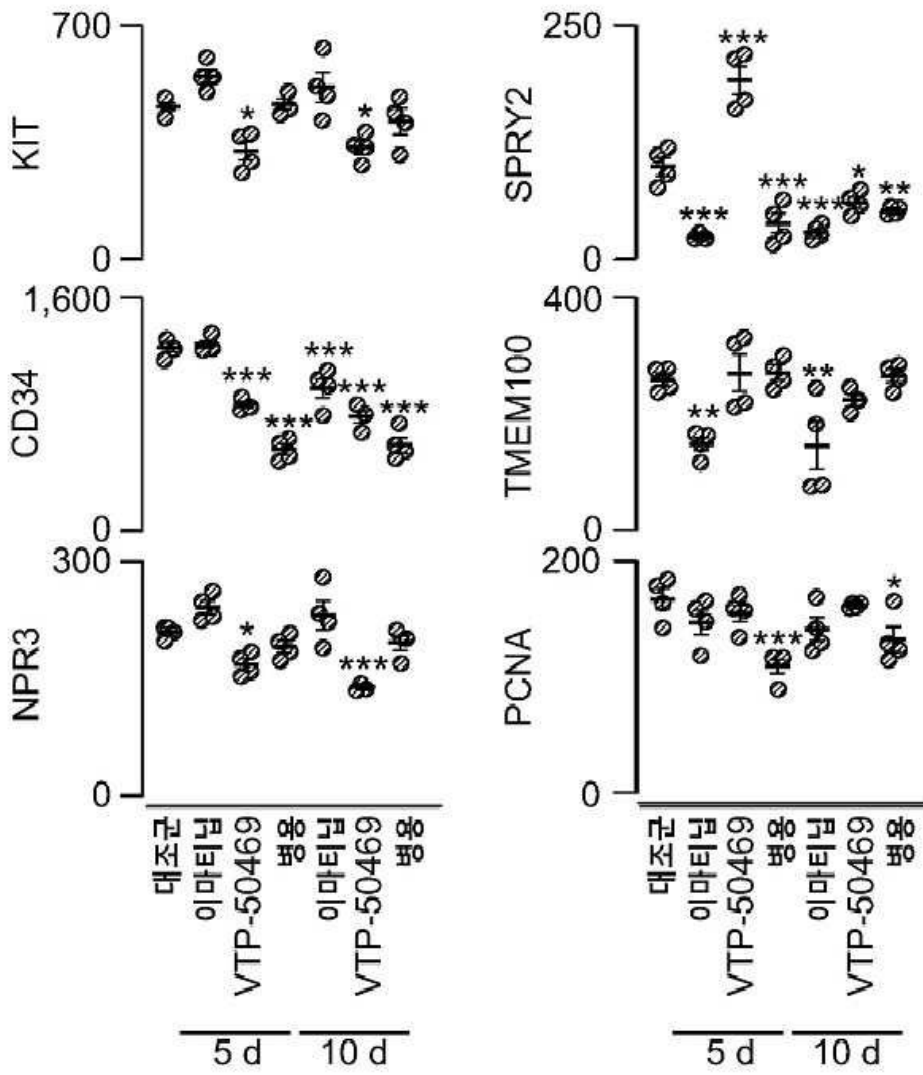
도면7d



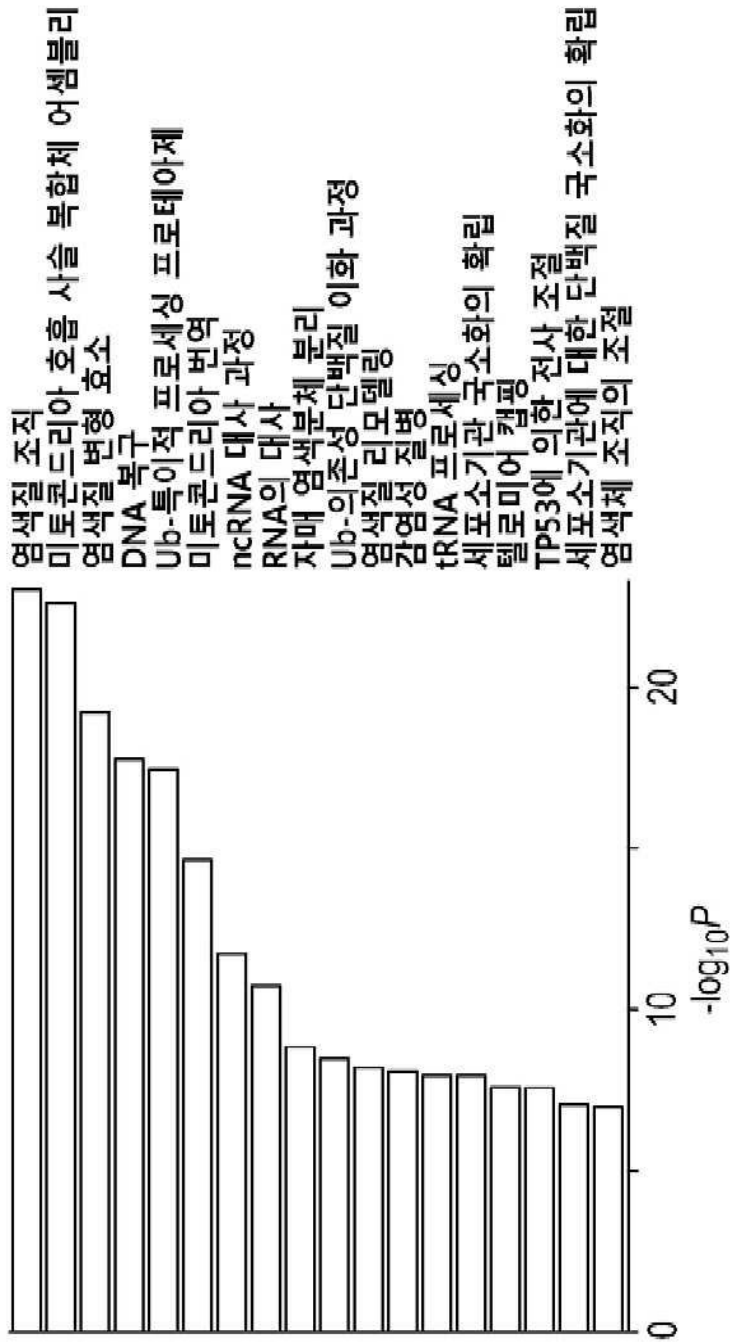
도면7e



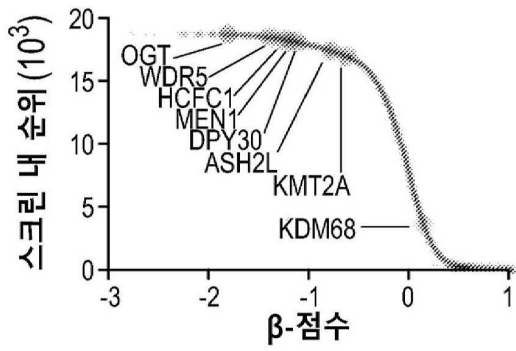
도면7f



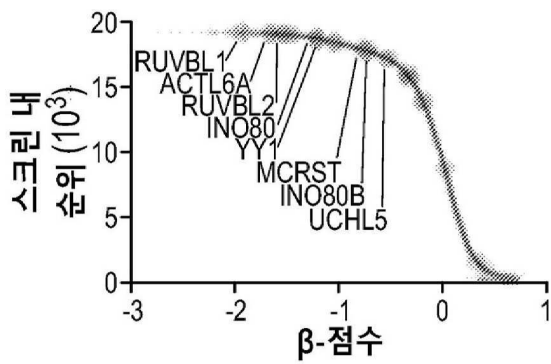
도면8a



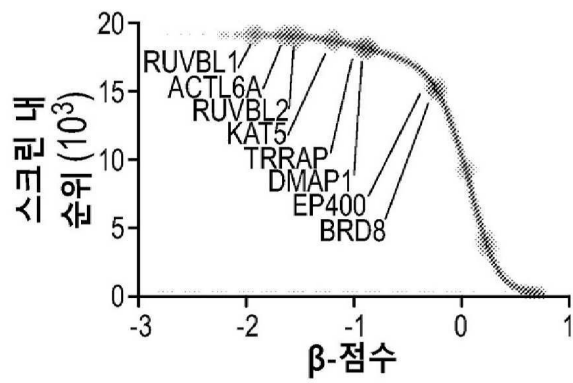
도면8b



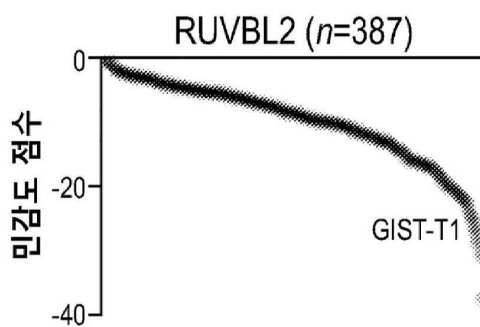
도면8c



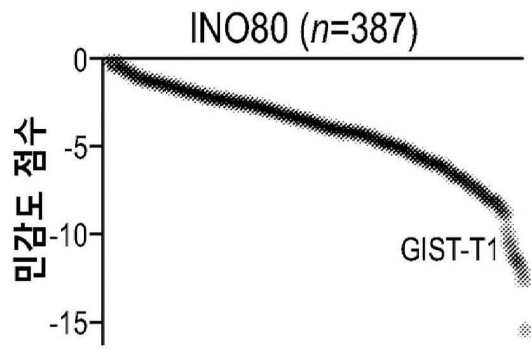
도면8d



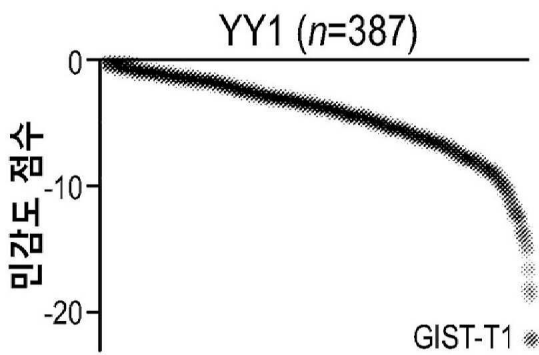
도면8e



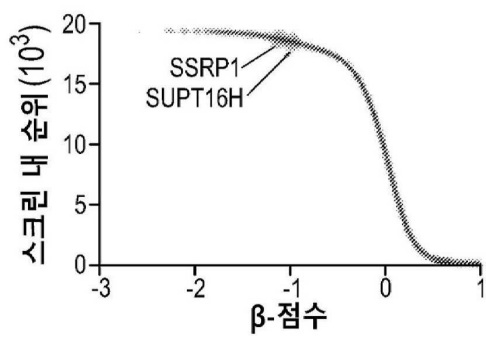
도면8f



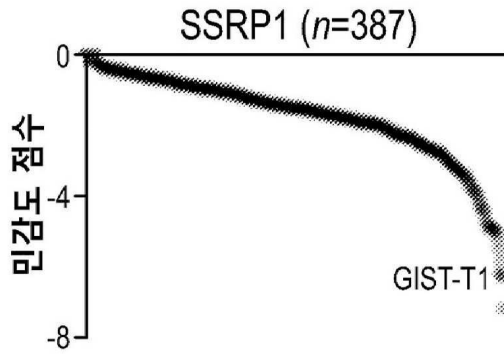
도면8g



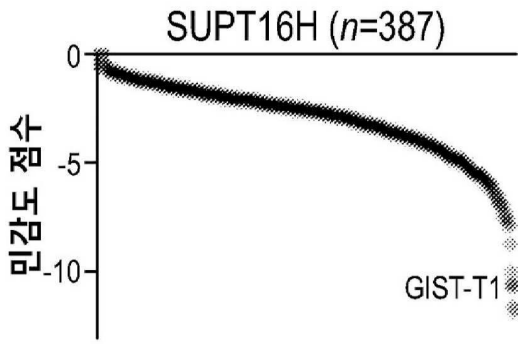
도면8h



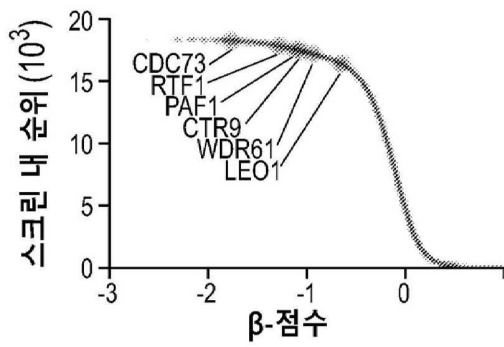
도면8i



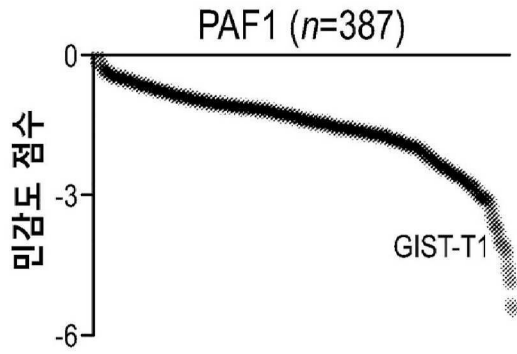
도면8j



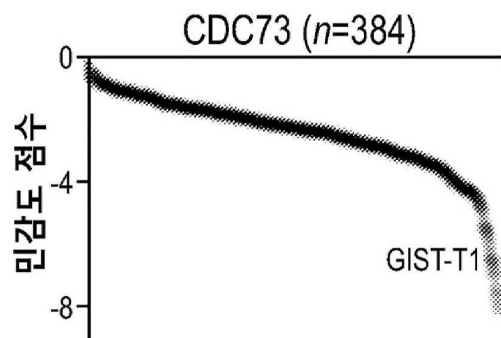
도면8k



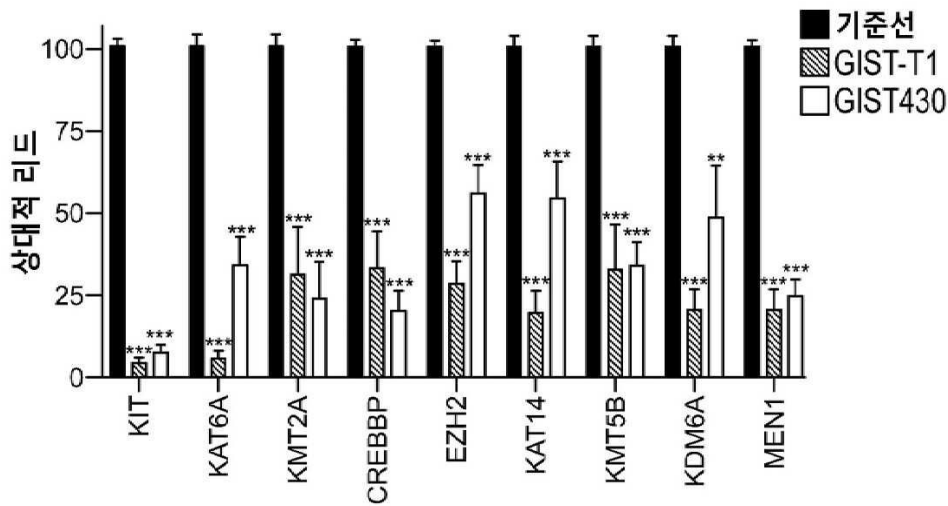
도면8l



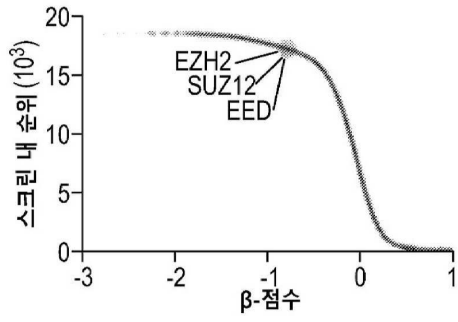
도면8m



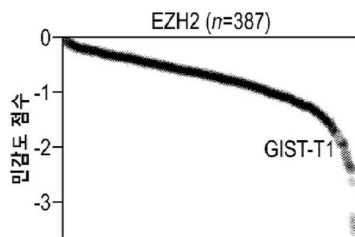
도면8n



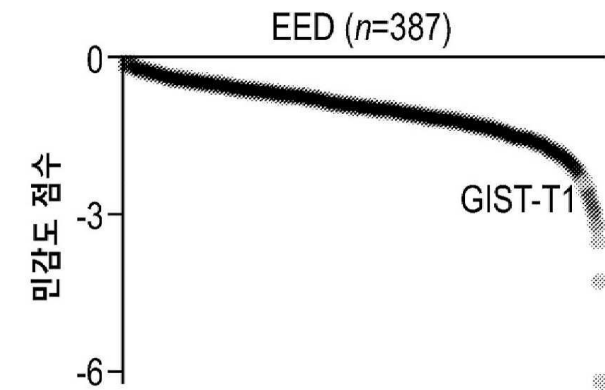
도면9a



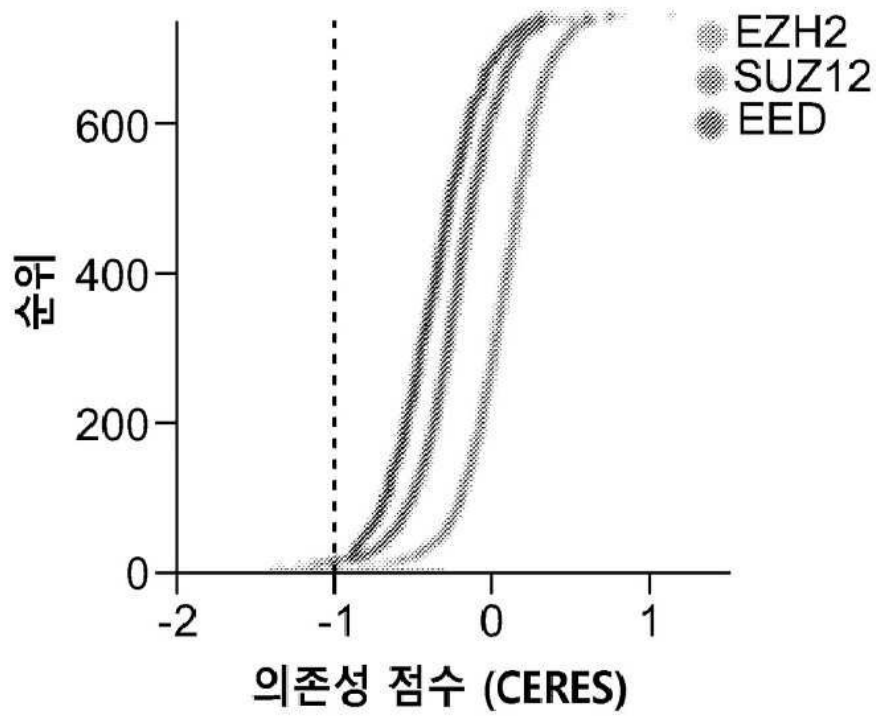
도면9b



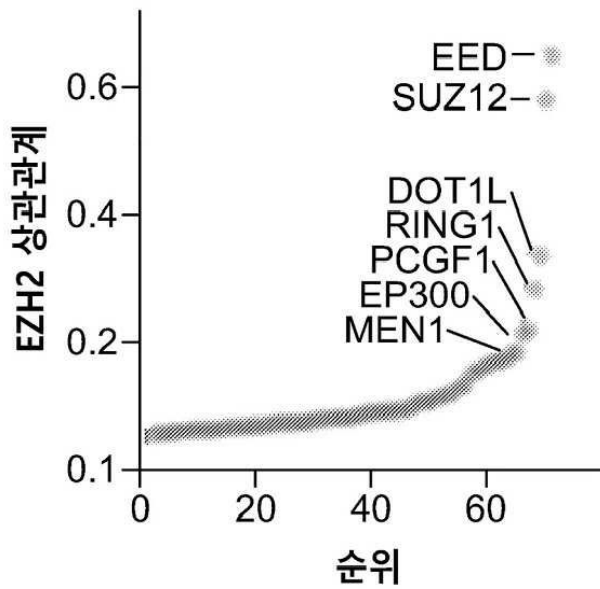
도면9c



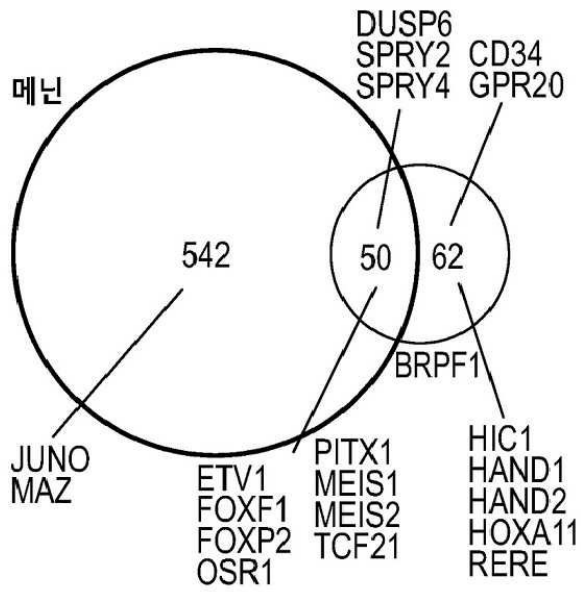
도면9d



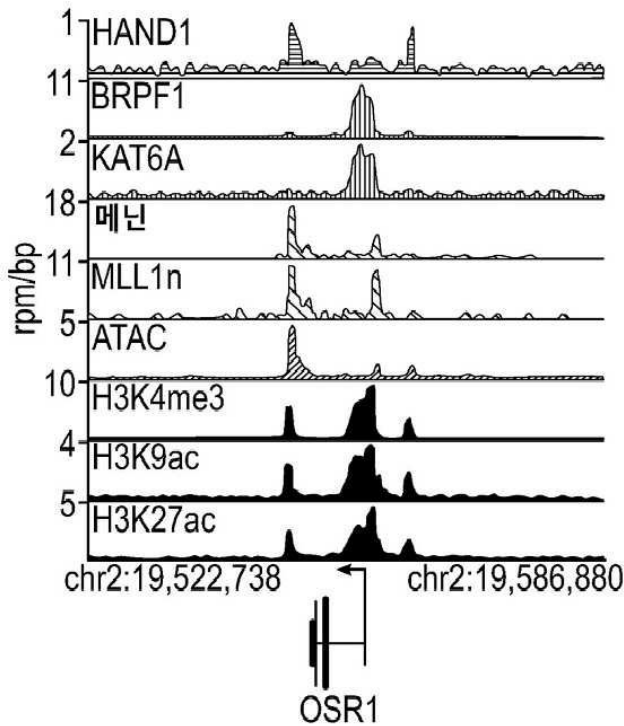
도면9e



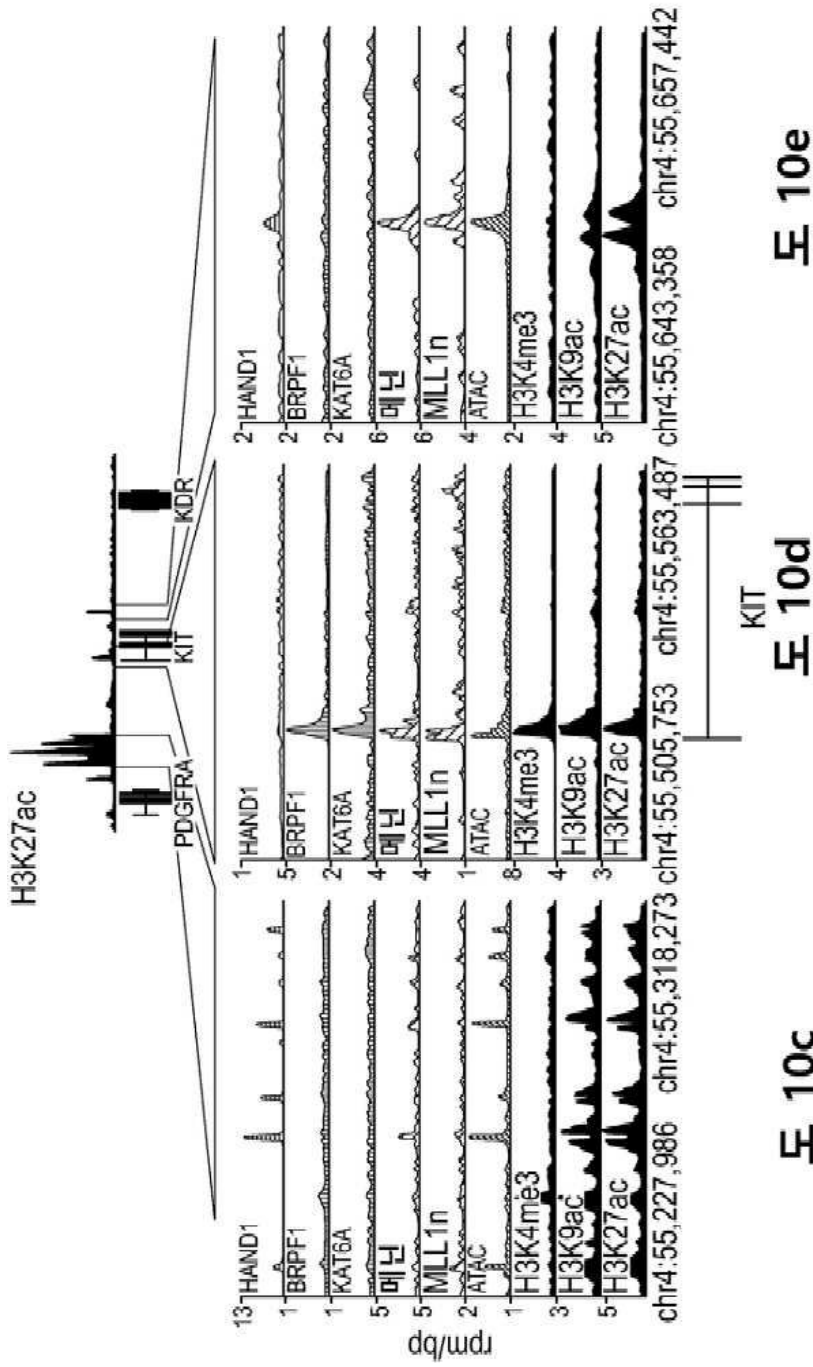
도면10a



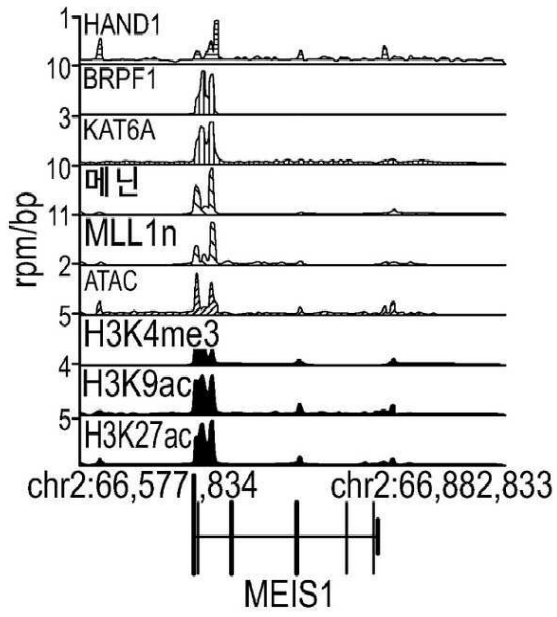
도면10b



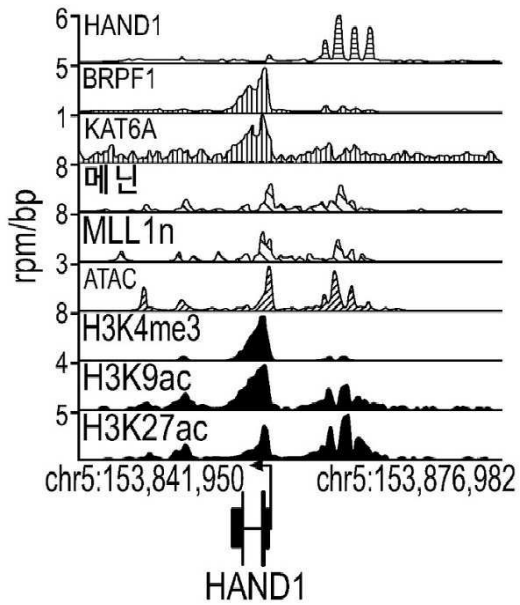
도면10cde



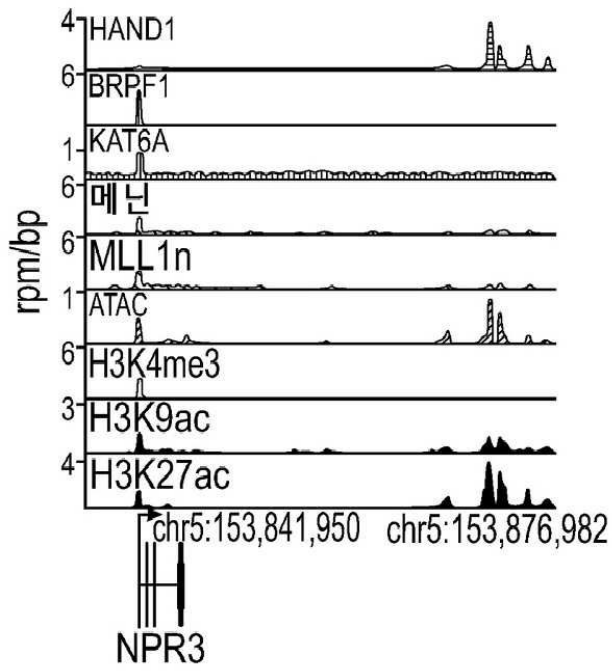
도면10f



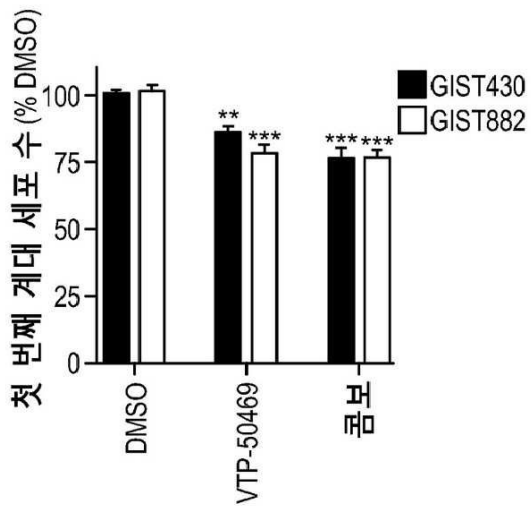
도면10g



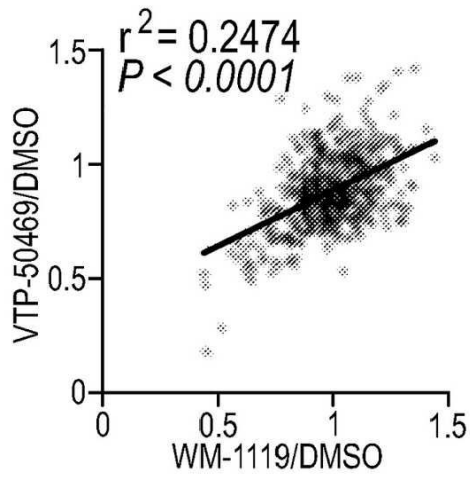
도면10h



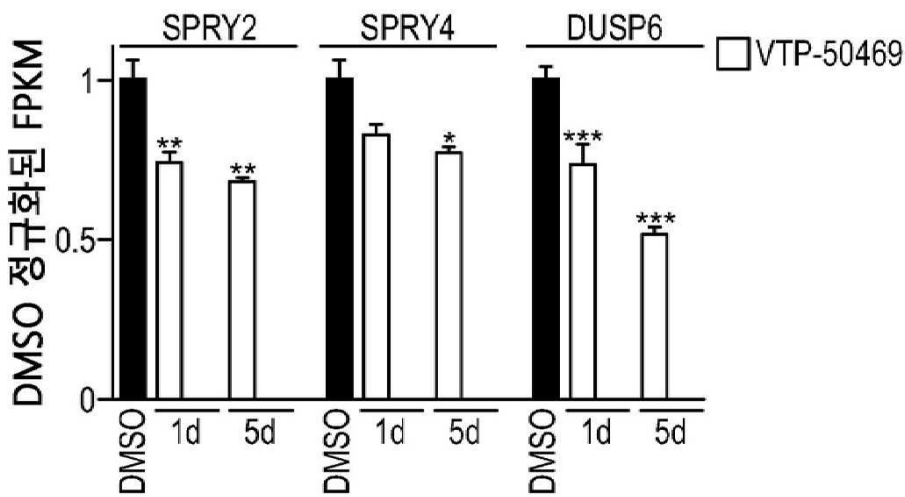
도면11



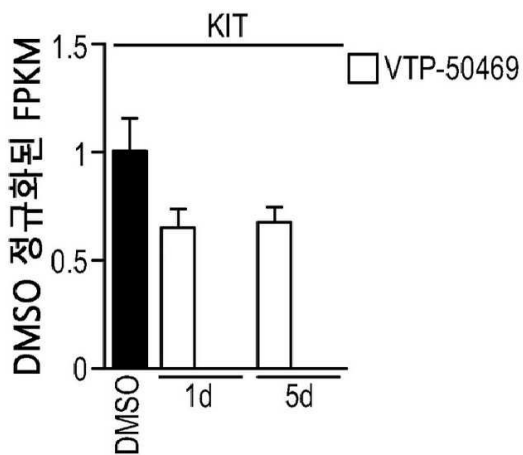
도면12a



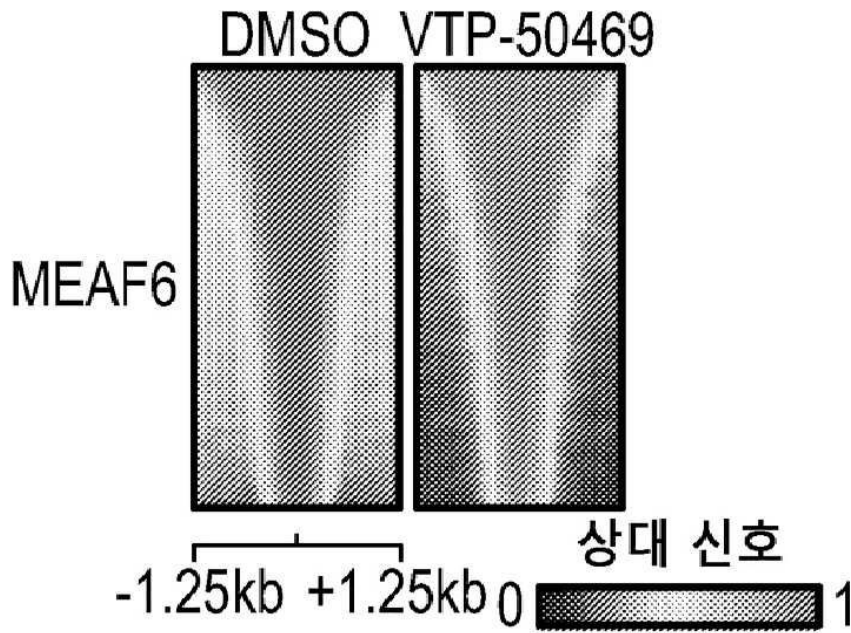
도면12b



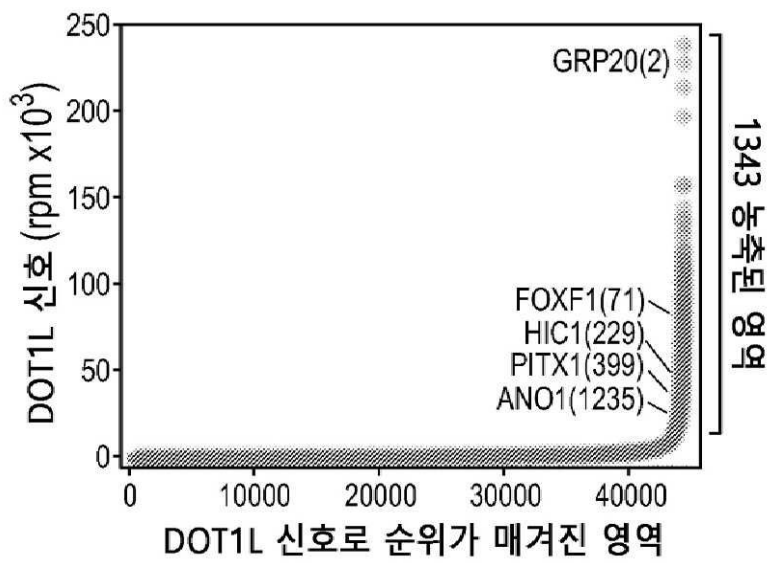
도면12c



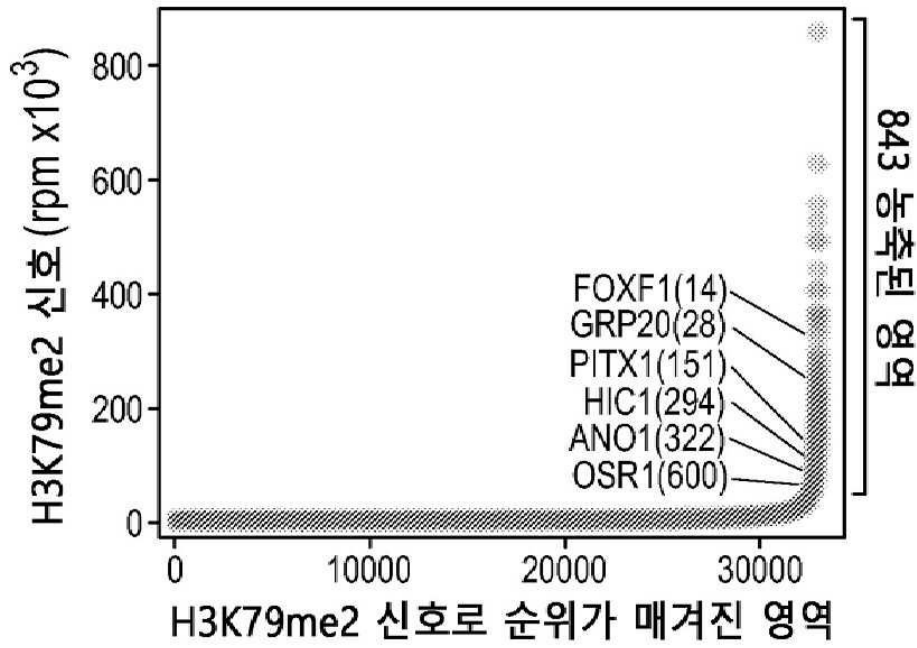
도면13a



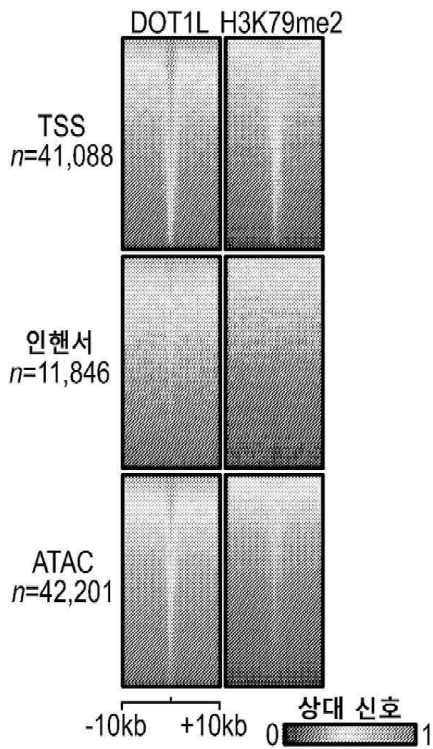
도면13b



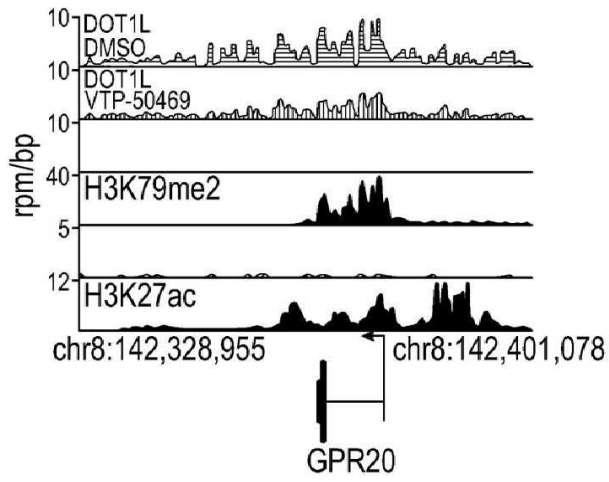
도면13c



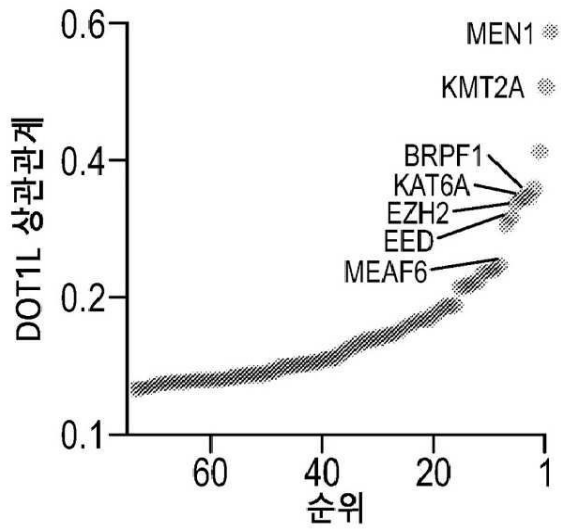
도면13d



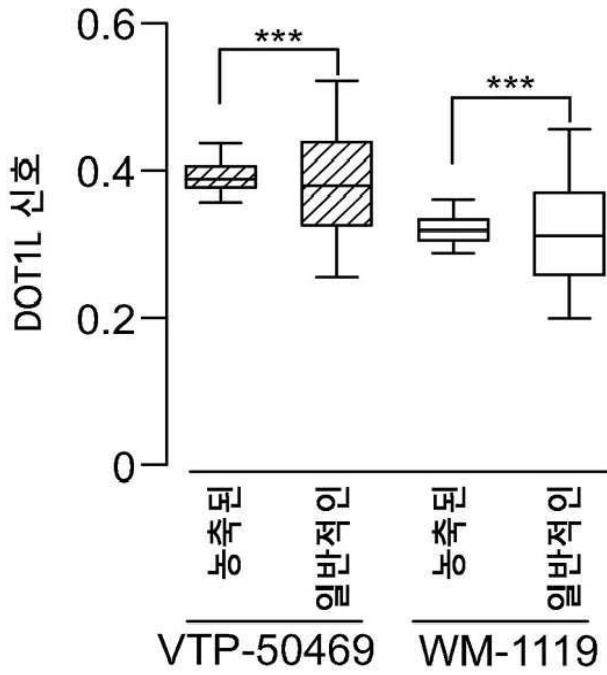
도면13e



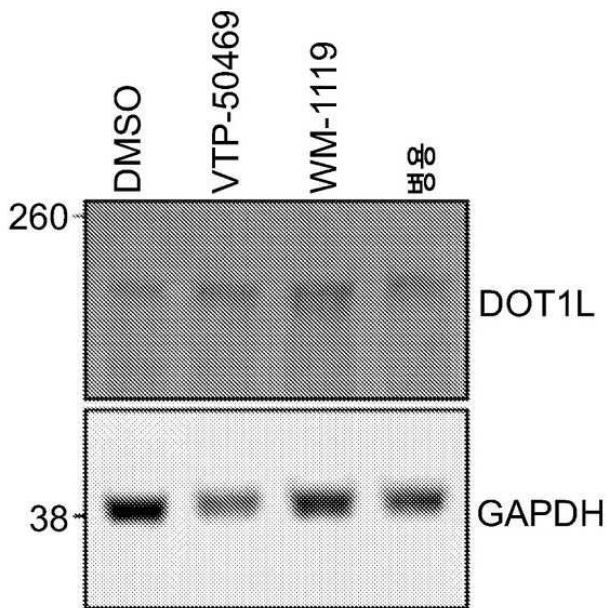
도면13f



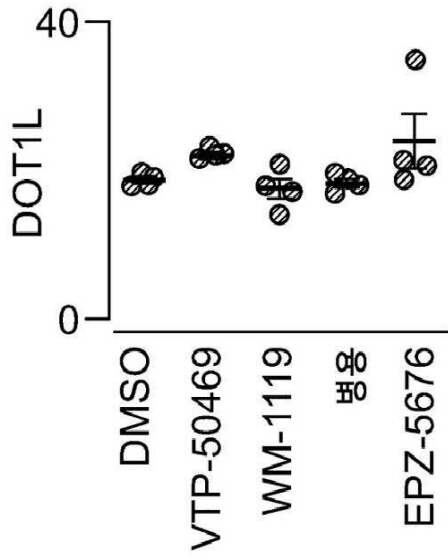
도면13g



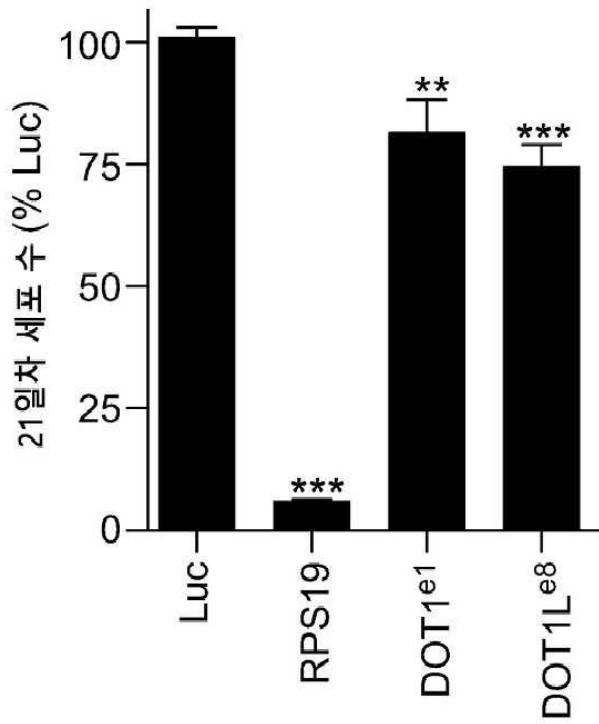
도면13h



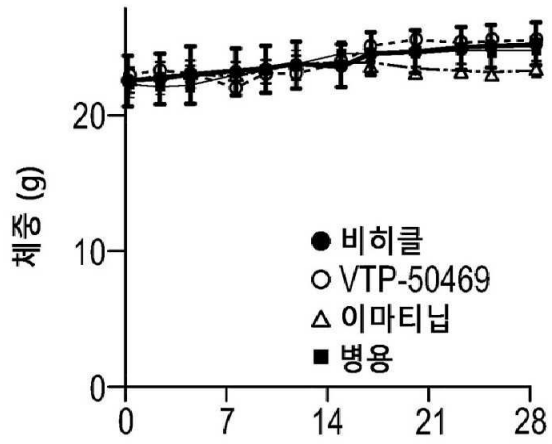
도면13i



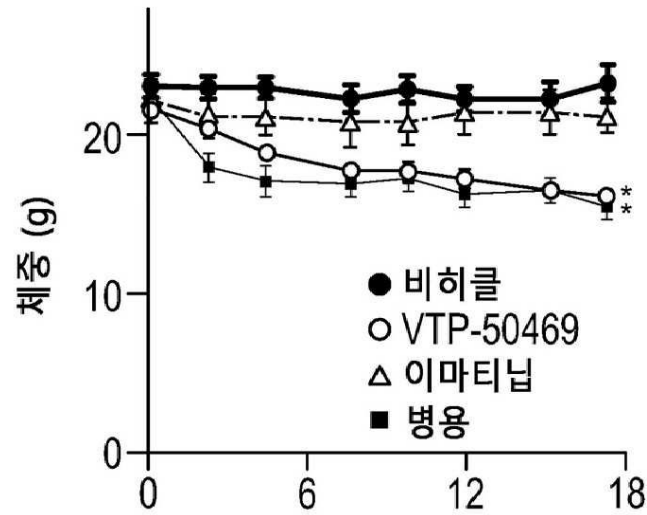
도면13j



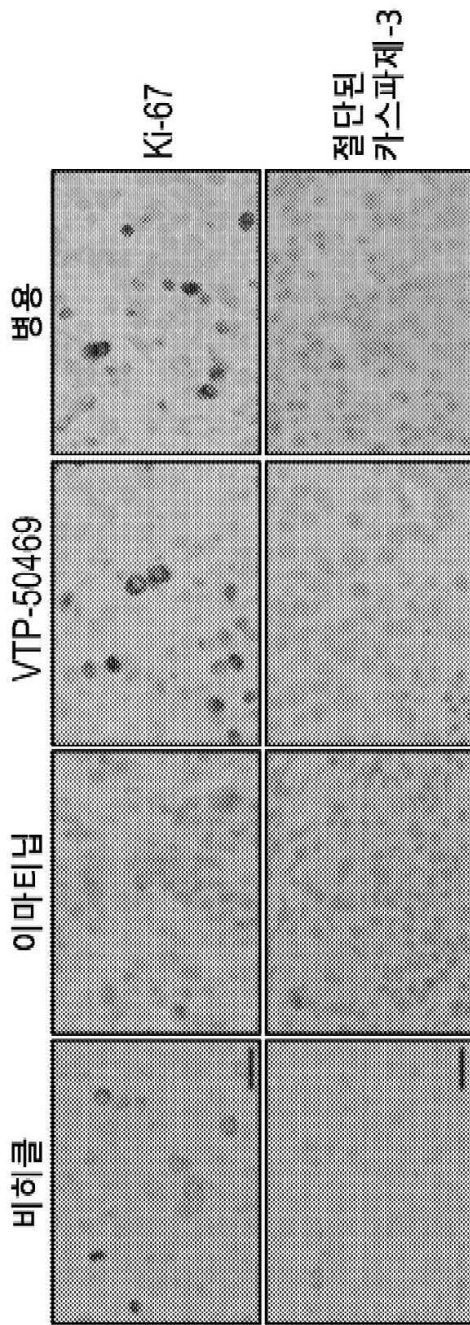
도면14a



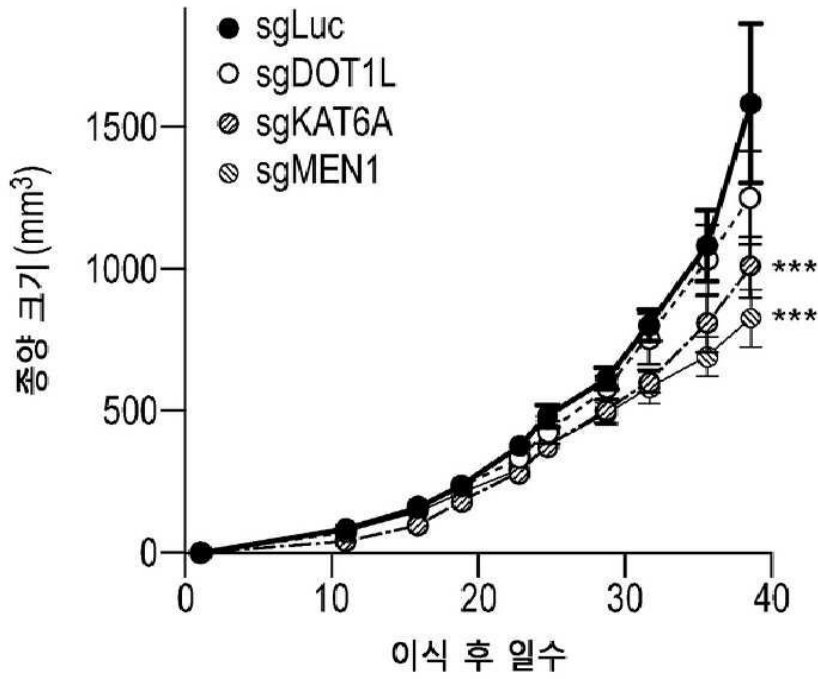
도면14b



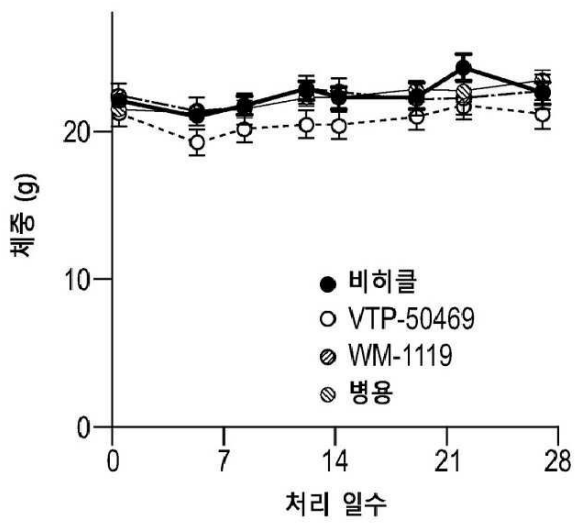
도면14c



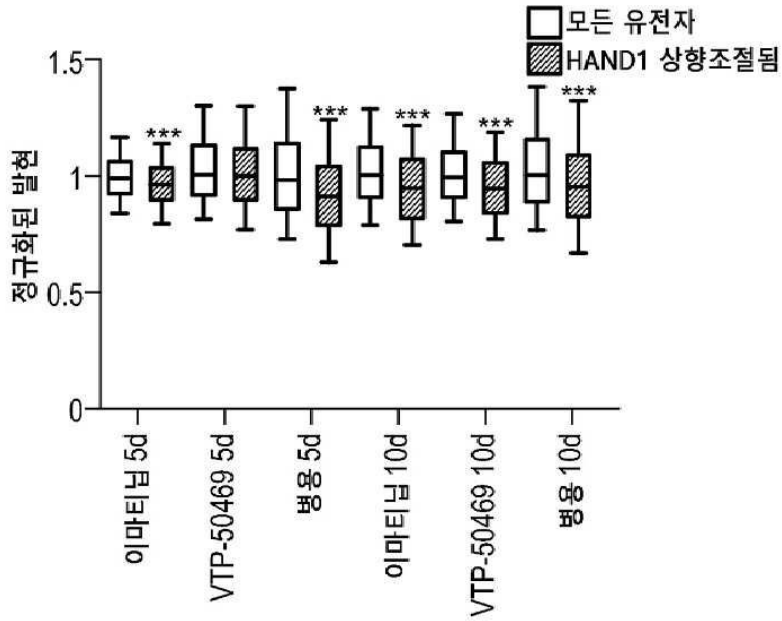
도면14d



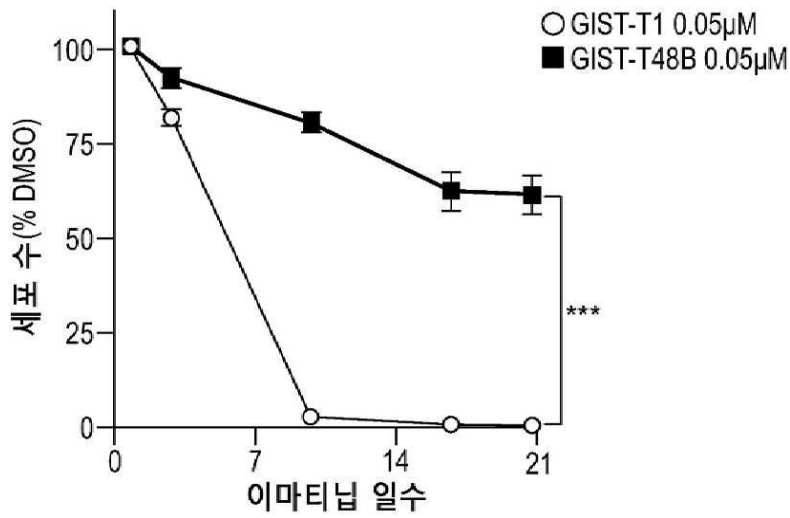
도면14e



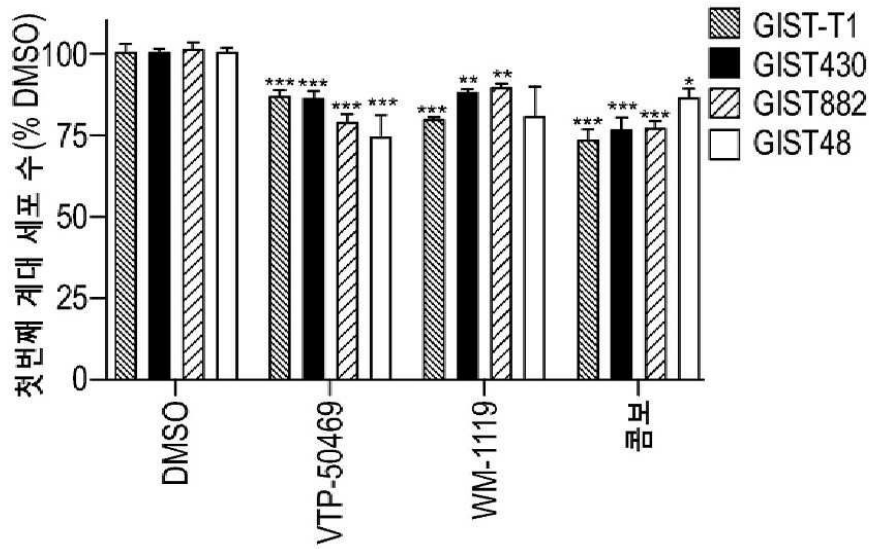
도면14f



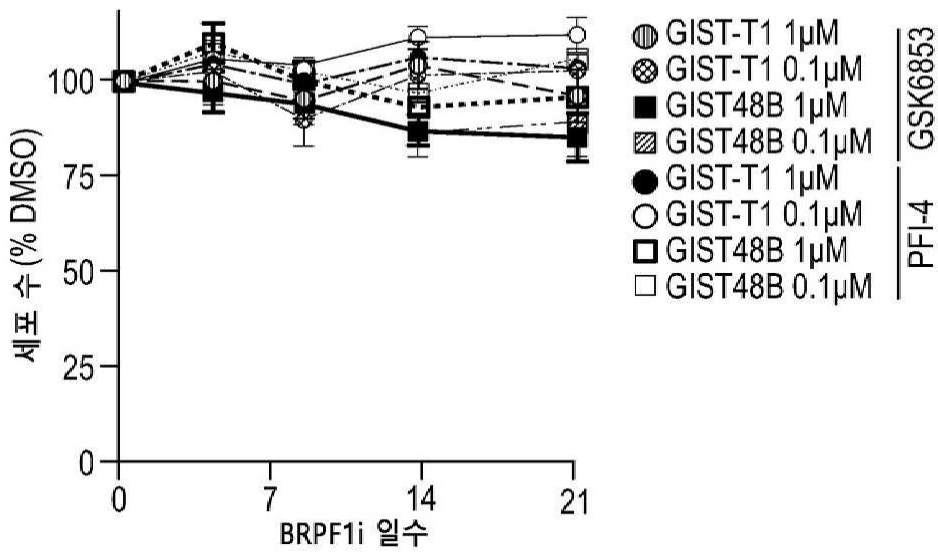
도면15a



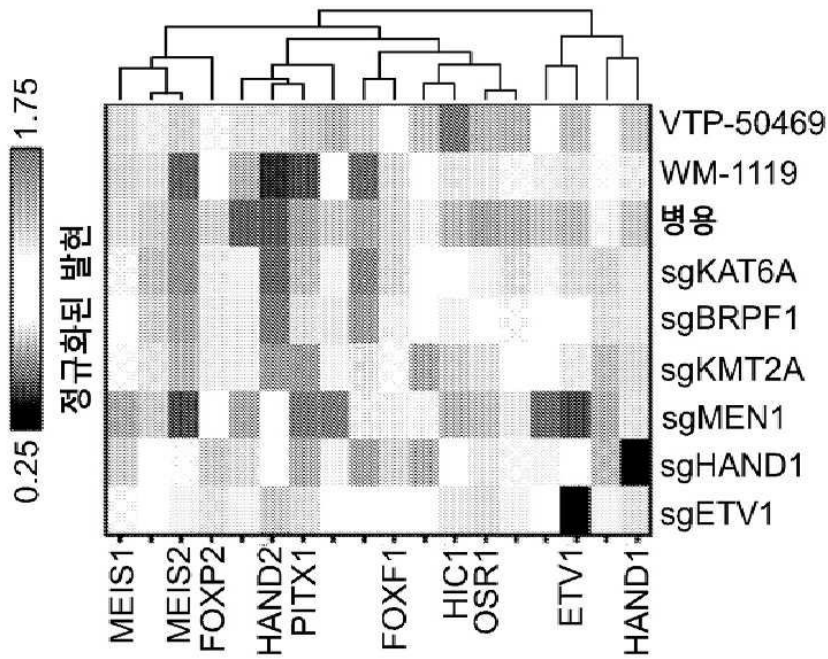
도면15b



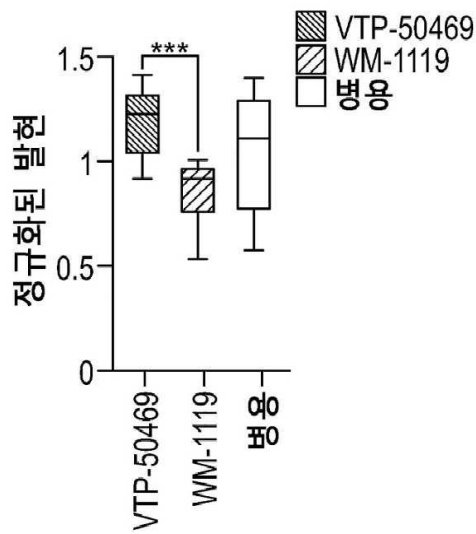
도면15c



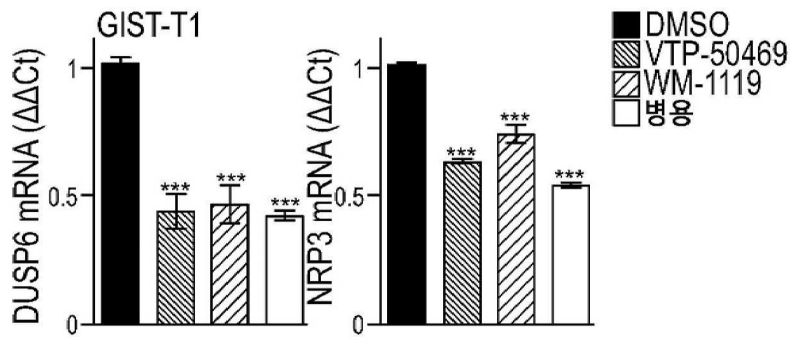
도면16a



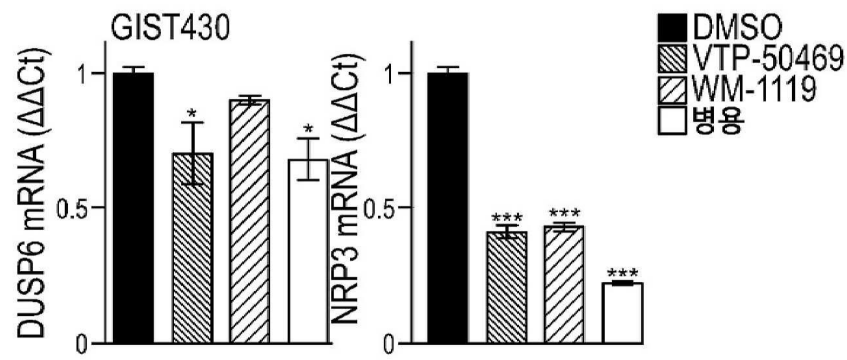
도면16b



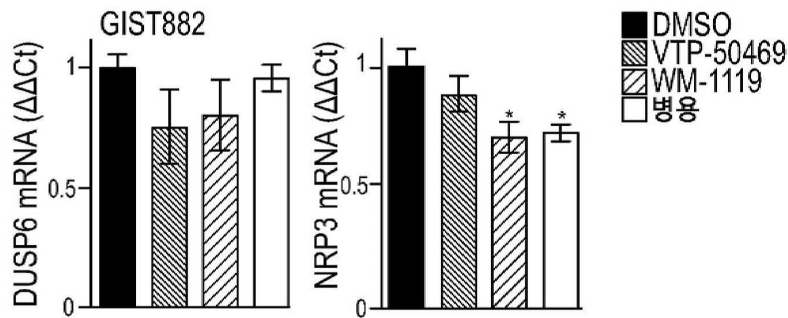
도면16c



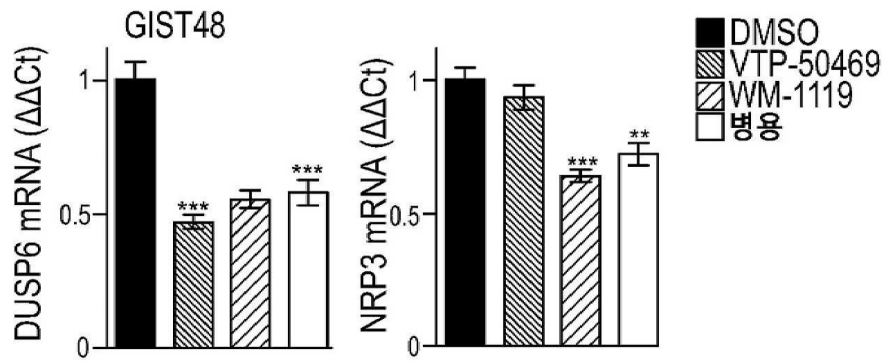
도면16d



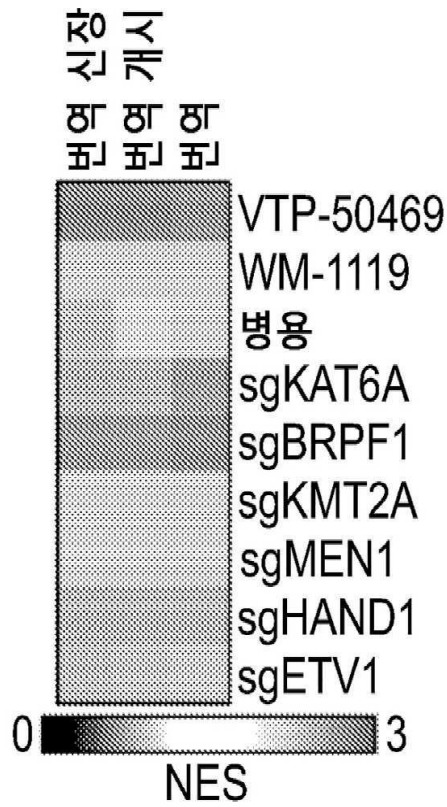
도면16e



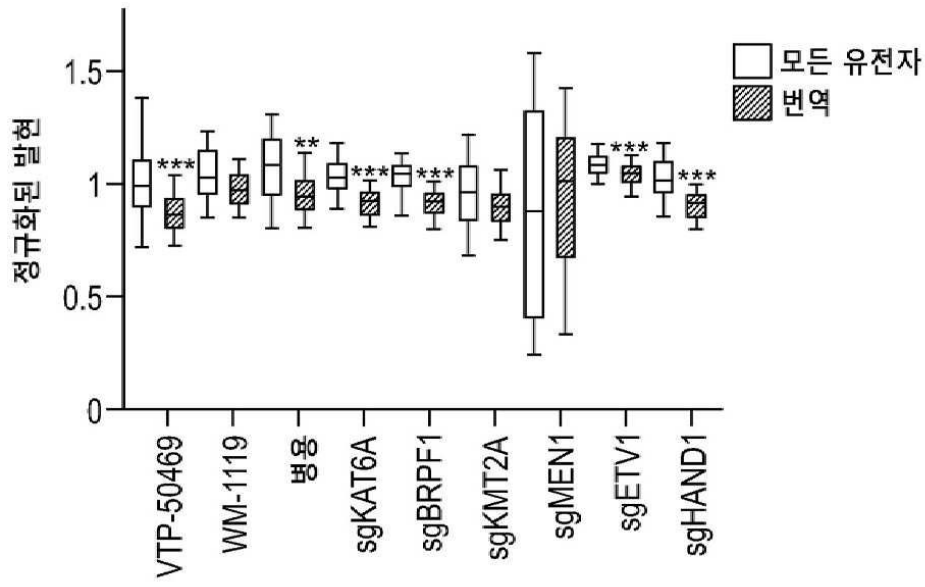
도면16f



도면16g



도면16h



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

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