



등록특허 10-2473113



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년12월01일
(11) 등록번호 10-2473113
(24) 등록일자 2022년11월28일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/5377 (2006.01) *A61K 31/404* (2006.01)
A61K 31/436 (2006.01) *A61K 31/4375* (2006.01)
A61K 31/496 (2006.01) *A61K 31/4965* (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01) *A61K 45/06* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/5377 (2013.01)
A61K 31/404 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-7017622
- (22) 출원일자(국제) 2014년12월08일
 심사청구일자 2019년12월06일
- (85) 번역문제출일자 2016년06월30일
- (65) 공개번호 10-2016-0085365
- (43) 공개일자 2016년07월15일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2014/069167
- (87) 국제공개번호 WO 2015/085325
 국제공개일자 2015년06월11일
- (30) 우선권주장
 61/913,063 2013년12월06일 미국(US)
 (뒷면에 계속)
- (56) 선행기술조사문헌
 WO2013155464 A1*
- *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 23 항

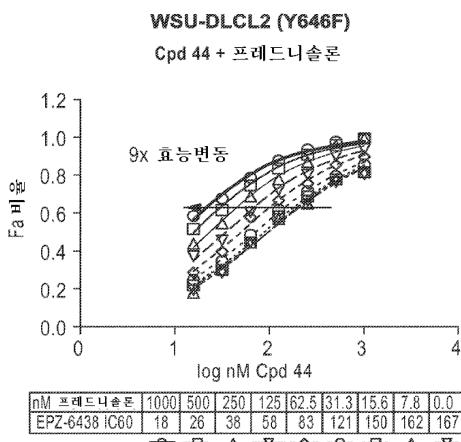
심사관 : 신영신

(54) 발명의 명칭 암 치료를 위한 병용 요법

(57) 요 약

본 발명은 인간 히스톤 메틸기전이효소 EZH2의 억제제와, 기타 치료제, 구체적으로 항암제, 예를 들어 프레드니손을 포함하는 조성물과, 암 치료를 필요로 하는 피험체에 상기 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 암 치료 병용 요법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도2a



(52) CPC특허분류

A61K 31/436 (2013.01)

A61K 31/4375 (2013.01)

A61K 31/496 (2013.01)

A61K 31/4965 (2013.01)

A61K 31/519 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

(30) 우선권주장

61/934,388 2014년01월31일 미국(US)

61/992,881 2014년05월13일 미국(US)

명세서

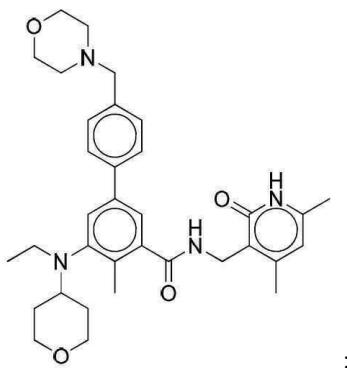
청구범위

청구항 1

치료학적 유효량의 EZH2 억제제를 포함하는, 림프종 치료를 필요로 하는 환자에서 림프종을 치료하기 위한 약학적 조성물로서,

상기 약학적 조성물이 치료학적 유효량의 치료 기준 제제와 조합되어 투여되고,

상기 EZH2 억제제가 하기 화학식을 가지는 화합물 44 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이고:



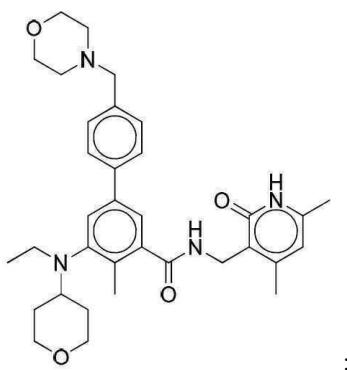
상기 치료 기준 제제가 MK-2206, 이텔랄리십, 트라메티닙, 타마티닙, 및 이브루티닙으로부터 선택되는 BCR 억제제인, 약학적 조성물.

청구항 2

치료학적 유효량의 치료 기준 제제를 포함하는, 림프종 치료를 필요로 하는 환자에서 림프종을 치료하기 위한 약학적 조성물로서,

상기 약학적 조성물이 치료학적 유효량의 EZH2 억제제와 조합되어 투여되고,

상기 EZH2 억제제가 하기 화학식을 가지는 화합물 44 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이고:



상기 치료 기준 제제가 MK-2206, 이텔랄리십, 트라메티닙, 타마티닙, 및 이브루티닙으로부터 선택되는 BCR 억제제인, 약학적 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 림프종이 비호지킨 림프종인, 약학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 비호지킨 림프종이 DLBCL(범발성 거대 B 세포 림프종) 또는 GCB(배 중심 B 세포 유사) 림프종

인, 약학적 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 림프종이 EZH2 돌연변이 림프종인, 약학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, EZH2 돌연변이 림프종이 Y646, A682 또는 A692 돌연변이를 가지는 것인, 약학적 조성물.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서,

- (a) 림프종이 EZH2 야생형 림프종이거나; 또는
- (b) 림프종이 H3K27에서의 증가된 삼메틸화를 특징으로 하거나; 또는
- (c) 림프종이 EZH2 억제제 내성 또는 EZH2 억제제 난치성 림프종인, 약학적 조성물.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서,

- (a) EZH2 억제제와 치료 기준 제제가 동시 또는 순차적으로 투여되거나; 또는
- (b) EZH2 억제제가 치료 기준 제제의 투여 전에 투여되는 것인, 약학적 조성물.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, 적어도 1개의 유전자가 환자에서 상향조절되며, 여기서 상기 유전자는 글루코코르티코이드 표적 유전자이거나, 세스트린, TNF 및 GILZ (Glucocorticoid-induced leucine zipper)로부터 선택되는 것인, 약학적 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

- (a) 상기 유전자의 상향조절이 EZH2 억제제의 치료학적 유효량을 결정 또는 조정하는 데 사용되거나; 또는
- (b) 상기 유전자의 상향조절이 치료 기준 제제의 치료학적 유효량을 결정 또는 조정하는 데 사용되는 것인, 약학적 조성물.

청구항 11

제1항 또는 제2항에 있어서, BCR 억제제가 MK-2206인, 약학적 조성물.

청구항 12

제1항 또는 제2항에 있어서, BCR 억제제가 이델랄리십인, 약학적 조성물.

청구항 13

제1항 또는 제2항에 있어서, BCR 억제제가 트라메티닙인, 약학적 조성물.

청구항 14

제1항 또는 제2항에 있어서, BCR 억제제가 타마티닙인, 약학적 조성물.

청구항 15

제1항 또는 제2항에 있어서, BCR 억제제가 이브루티닙인, 약학적 조성물.

청구항 16

제1항 또는 제2항에 있어서, 림프종이 EZH2 야생형 림프종인, 약학적 조성물.

청구항 17

제1항 또는 제2항에 있어서, 림프종이 H3K27에서의 증가된 삼메틸화를 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 18

제1항 또는 제2항에 있어서, 림프종이 EZH2 억제제 내성 또는 난치성 림프종인, 약학적 조성물.

청구항 19

제1항 또는 제2항에 있어서, EZH2 억제제와 치료 기준 제제가 동시 또는 순차적으로 투여되는, 약학적 조성물.

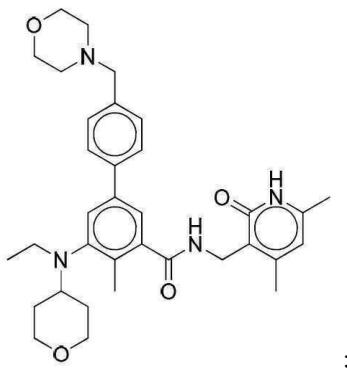
청구항 20

제1항 또는 제2항에 있어서, EZH2 억제제가 치료 기준 제제의 투여 전에 투여되는 것인, 약학적 조성물.

청구항 21

치료학적 유효량의 EZH2 억제제 및 치료학적 유효량의 치료 기준 제제를 포함하는, 림프종 치료를 필요로 하는 환자에서 림프종을 치료하기 위한 약학적 조합물로서,

상기 EZH2 억제제가 하기 화학식을 가지는 화합물 44 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이고:



상기 치료 기준 제제가 MK-2206, 이텔랄리십, 트라메티닙, 타마티닙, 및 이브루티닙으로부터 선택되는 BCR 억제제인, 약학적 조합물.

청구항 22

제21항에 있어서, EZH2 억제제가 치료 기준 제제와 조합되어 환자에게 투여되는, 약학적 조합물.

청구항 23

제21항에 있어서, EZH2 억제제 및 치료 기준 제제를 포함하는 조성물인, 약학적 조합물.

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

발명의 설명

기술 분야

관련 출원들

[0001] 본 출원은 미국 출원 번호 61/913,063(2013년 12월 6일 출원), 61/934,388(2014년 1월 31일 출원) 및 61/922,881(2014년 5월 13일 출원)에 대한 우선권과 그 이익을 주장하며, 이를 각각의 내용은 본원에 전체가 참고로 포함되어 있다.

본 발명의 분야

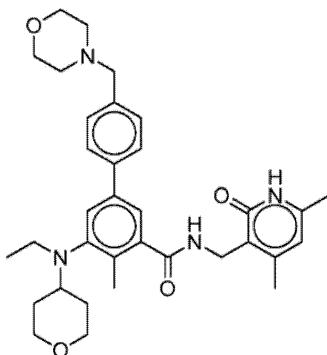
[0004] 본 발명은 인간 히스톤 메틸기전이효소 EZH2의 억제제, 히스톤 H3상 리신 27(H3-K27)의 일메틸화 내지 삼메틸화를 촉매화하는 PRC2 복합체의 촉매 서브유닛, 그리고 기타 치료제, 특히 항암제 1개 이상을 포함하는 조성물과, 암 치료를 위한 병용 요법에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 암의 병용 요법 치료는, 부분적으로는 다수의 방안들을 통해 질병을 공격하는 것으로 인지된 이점으로 말미암아 더 일반적으로 행하여지고 있다. 비록 지난 수십년에 걸쳐 다수의 효과적인 병용 요법 치료가 알려져 왔지만; 매년 암으로 인한 사망자수가 계속해서 증가하는 것을 보았을 때, 항암 치료에 사용될 효과적인 치료계획들을 찾을 필요성은 여전히 있다.

발명의 내용

[0006] 본 발명은 적어도 부분적으로 EZH2 억제제, 예를 들어 화합물 44(EPZ-6438, E7438이라고도 알려짐), 즉



는, EZH2 돌연변이 상태와는 상관없이, 현재 사용되고 있는 치료 기준(standard of care)을 비롯한 다양한 제제와 조합되어 임의의 암을 치료함에 있어 매우 유효하다는 발견을 기반으로 하고 있다. 특정 구현예에서, 암은 림프종이다. 특정 구현예에서, 암은 배 중심 B 세포(GCB) 기원의 범발성 대형 B 세포 림프종(DLBCL) 또는 비호지킨 림프종(NHL)이다. 특정 구현예들에서, 림프종은 EZH2 돌연변이체 림프종이다. 특정 구현예들에서, 림프종은 EZH2 비 돌연변이체 림프종 또는 EZH2 야생형 림프종이다. 본 발명은 또한, EZH2 억제제, 예를 들어 화합물 44와 글루코코르티코이드 수용체 작동제(GRag), 예를 들어 프레드니손, 프레드니솔론 또는 텍사메타손이 암에 있어서 치료 활성이 극적으로 증가하도록 협조한다는 발견을 기반으로 하고 있다. 화합물 44와 프레드니솔론의 조합은 EZH2 억제에 감수성인 세포의 범위를 오로지 돌연변이체 보유 GCB NHL 세포로부터 모든 GCB NHL 세포에 이르기까지로 확장한다.

[0007] 하나의 양태에서, 본 발명은, 치료학적 유효량의 EZH2 억제제와 치료학적 유효량의 치료 기준 제제를 투여하는 단계를 포함하는, 상기 EZH2 억제제와 치료 기준 제제의 투여를 필요로 하는 환자에 있어서 암을 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0008] 다른 양태에서, 본 발명은, EZH2 억제제 및 치료 기준 제제를 포함하는 조합 치료학적 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 상기 조합의 투여를 필요로 하는 환자에 있어서 암을 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 양태는 EZH2 억제제 및 치료 기준 제제를 포함하는 조성물 치료학적 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 상기 조성물의 투여를 필요로 하는 환자에 있어서 암을 치료하는 방법에 관한 것이다.

- [0010] 몇몇 구현예에서, EZH2 돌연변이체 림프종은 Y646, A682 또는 A692 돌연변이이다.
- [0011] 몇몇 구현예들에서, 치료 기준 제제는 R-CHOP 성분, BCL 억제제 및 BCR 억제제로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물 1 개 이상이다.
- [0012] 몇몇 구현예들에서, R-CHOP는 CHOP의 GRag 성분인 프레드니솔론 또는 텍사메타손이다.
- [0013] 몇몇 구현예에서, R-CHOP는 글루코코르티코스테로이드 수용체 작동제이다. 특정 구현예에서, 글루코코르티코스테로이드 수용체 작동제는 프레드니솔론 또는 텍사메타손이다.
- [0014] 몇몇 구현예에서, 독소루비신은 R-CHOP로부터 배제된다.
- [0015] 몇몇 구현예에서, BCL 억제제는 나비토클락스, 오바토클락스 또는 ABT-19이다.
- [0016] 몇몇 구현예에서, BCR 억제제는 리툭시맙, AKT 억제제 MK-2206, 이델랄리십, 트라메티닙, 타마티닙, 에베로리무스 또는 이브루티닙이다.
- [0017] 몇몇 구현예들에서, BCR 억제제는 PI3K/Akt/mTOR 신호전달 케스케이드 억제제이다.
- [0018] 몇몇 구현예들에서, BCR 억제제는 리툭시맙, MK-2206, 이델랄리십, 트라메티닙, 타마티닙, 에베로리무스, VELCADE 또는 이브루티닙이다.
- [0019] 몇몇 구현예들에서, EZH2 억제제와 치료 기준 제제는 동시에 또는 순차적으로 투여된다. 다른 구현예들에서, EZH2 억제제는 치료 기준 제제 투여 이전에 투여된다.
- [0020] 몇몇 구현예들에서, 적어도 1 개의 유전자는 환자에 있어서 상향조절된다. 특정 구현예들에서, 상향조절된 유전자는 세스트린(Sestrin), TNF 및 GILZ로 이루어진 군으로부터 선택된다. 다른 구현예들에서, 유전자, 즉 상향조절된 유전자는 글루코코르티코이드 표적 유전자이다.
- [0021] 몇몇 구현예들에서, 유전자의 상향조절은 EZH2 억제제와 치료 기준 제제 치료학적 유효량을 결정하거나 조정하는데 사용된다.
- [0022] 다른 양태에서, 본 발명은 치료 대상인 환자를 선택하는 방법에 관한 것인데, 여기서 환자는 세스트린, TNF 및 GILZ로 이루어진 군으로부터 선택되는 유전자 1 개 이상의 발현 프로필을 기반으로 선택된다.
- [0023] 하나의 양태에서, 본 발명은, 치료학적 유효량의 EZH2 억제제와 치료학적 유효량의 치료 기준 제제를 투여하는 단계를 포함하는, 상기 EZH2 억제제와 치료 기준 제제의 투여를 필요로 하는 환자에서 암을 치료하는 방법에 관한 것이고, 여기서 환자는 세스트린, TNF 또는 GILZ의 발현이 상향조절된다.
- [0024] 몇몇 구현예에서, 암은 EZH2 억제제 내성(resistant) 또는 난치성(refractory) 암이다.
- [0025] 몇몇 구현예에서, 암은 H3K27에서의 삼메틸화 증가에 의해 특징지어진다.
- [0026] 본 발명의 하나의 양태는, EZH2 억제제 내성 또는 난치성 돌연변이체 세포, 예를 들어 EZH2 돌연변이 보유 세포에 있어서 비감수성을 역전시키는 EZH2 억제제와 GRag의 조합에 관한 것이다.
- [0027] 특정 구현예들에서, EZH2 억제제는 화합물 44, 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물과, 기타 치료제 1 개 이상이다.
- [0028] 본 발명의 다른 특징들과 이점들은 이하 상세한 설명 및 청구항들로부터 분명해질 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0029] 도 1의 A 내지 F는 돌연변이체 EZH2 배 중심 B 세포 림프종 세포주에 있어서 CHOP 성분들과 화합물 44(Cpd44)로 인하여 얻어지는 복합 이익(combination benefit)을 나타내는 일련의 Fa-Cl 플롯들이다. 화합물 44와 독소루비신은 WSU-DLCL2 세포에서 상승 작용하고(도 1의 A), SU-DHL-10 세포에서는 부가 효과를 나타낸다(도 1의 D). 복합 이익은 마포스파미드가 WSU-DLCL2 세포에 사용될 때(도 1의 C) 그리고 SU-DHL-10 세포에 사용될 때(도 1의 F) 관찰된다. 복합 이익은 또한 빙크리스틴이 EZH2 Y646 돌연변이체 세포주 둘 다(즉 WSU-DLCL2 세포(도 1의 B) 및 SU-DHL-10 세포(도 1의 E))에 사용될 때에도 관찰된다. WSU-DLCL2에 있어서 용량은 독소루비신이 0.16 nM 내지 20 nM이었고, 빙크리스틴은 0.04 nM 내지 5 nM이었으며, 마포스파미드는 0.156 μ M 내지 10 μ M이었고, 화합물 44는 15 nM 내지 1000 nM이었다. SU-DHL-10 세포에 있어서 용량은 독소루비신이 0.5 nM 내지 60 nM이었고, 빙크리스틴은 0.016 nM 내지 2 nM이었으며, 마포스파미드는 0.156 μ M 내지 10 μ M이었고, 화합물 44는 1.56 nM

내지 100 nM이었다. 세포들은 전처리 모델 A에 따라서 처리되었으며, 데이터는 Calcusyn 소프트웨어가 사용되어 분석되었다.

도 2a 내지 2d는 글루코코르티코이드 작동제들이 EZH2 돌연변이체 림프종 주들에 있어서 화합물 44(Cpd44)의 효능을 증가시키는 것을 도시하고 있는 일련의 플롯들이다. 화합물 44의 효능은 이 화합물 44가 글루코코르티코이드 작동제와 조합될 때 극적으로 증가하였다. 전처리 모델 A에 따라서 2 개의 EZH2 Y646F 돌연변이체 DLBCL 주들에 프레드니솔론이 부가되었을 때(도 2a, 2c), 또는 텍사메타손이 부가되었을 때(도 2b, 2d), 화합물 44의 IC₅₀은 용량 의존적 변동을 나타낸다. 상기 두 세포주들에 있어서 프레드니솔론의 용량 범위는 15 nM 내지 1000 nM이었고, 텍사메타손의 용량 범위는 1.5 nM 내지 100 nM이었다. 화합물 44의 용량 범위는, WSU-DLCL2 세포의 경우에는 15 nM 내지 1000 nM이었고, SU-DHL-10 세포의 경우에는 1.5 nM 내지 100 nM이었다.

도 3a 내지 3d는, WSU-DLCL2 EZH2 돌연변이체(도 3a, 3b)와 DOHH2 EZH2 야생형(도 3c, 3d) GCB 림프종 세포주에 있어서 화합물 44(Cpd 44)와, 프레드니솔론 또는 텍사메타손의 각각의 조합의 이익들을 나타내는, 일련의 용량 응답 플롯들이다. 화합물 44의 용량 범위는 15.6 nM 내지 1000 nM이었고, 프레드니솔론의 용량 범위는 7.8 nM 내지 1000 nM이었으며, 텍사메타손의 용량 범위는 0.8 nM 내지 100 nM이었다(도 3a 및 도 3b). 화합물 44의 효능은 EZH2 돌연변이체 WSU-DLCL2 세포에 있어서 프레드니솔론 또는 텍사메타손이 사용될 때 증가하였다(도 3c 및 3d). 화합물 44는 DOHH2 EZH2 야생형 세포에서 단일 제제로서는 항증식 효과를 나타내지 않았으므로, 프레드니솔론 또는 텍사메타손의 효능 변동이 확인되었다. DOHH2 세포에 있어서 프레드니솔론 또는 텍사메타손의 효능은 화합물 44가 첨가되었을 때 증가하였다.

도 4는, 화합물 44(Cpd 44)/글루코코르티코이드 작동제 조합이 EZH2 억제제(EZH2i)에 내성인 세포주 내에서 EZH2 억제제 비감수성을 극복한다는 것을 나타내는 요약 표이다. 전체적으로 프레드니솔론과 화합물 44의 조합은 EZH2i 감수성 세포주에서만이 아니고, 테스트 대상인 모든 GCB 세포에서 더 큰 감수성을 유도한다. RL 세포의 경우를 제외하고, 약물 첨가 순서는 중요한데, 그 이유는 프레드니솔론과의 예비 항온처리후 화합물 44가 투여되는 것은 효과적이지 않기 때문이다.

도 5의 A 및 B는, 화합물 44(Cpd44)와 다른 표적화 요법들이 조합되어 적용될 때 EZH2 돌연변이체 림프종 세포주에서 관찰되는 매우 강력한 상승효과를 나타내는 플롯 2 개다. 매우 강력한 상승효과는 화합물 44가, BCL2 억제제인 나비토클락스와 조합되어 투여될 때(도 5의 A), 그리고 mTOR 억제제 에베로리무스와 조합되어 투여될 때(도 5의 B) 관찰된다. 나비토클락스의 용량 범위는 0.16 μ M 내지 10 μ M이고, 에베로리무스의 용량 범위는 0.04 nM 내지 5 nM이며, 화합물 44의 용량 범위는 31 nM 내지 2000 nM이다. 이와 같은 데이터는 전처리 모델 A에서 구하여졌으며, 데이터는 Calcusyn 소프트웨어가 사용되어 분석되었다.

도 6은, 화합물 44(Cpd 44)가 사용되는 약물 요법들 및/또는 다양한 약물들의 조합으로부터 얻어진 결과에 대한 요약 표이다. EZH2 돌연변이체 림프종 주들에서 화합물 44로 인한 복합 이익은 테스트 대상인 모든 약물이 사용될 때 달성되었다. 글루코코르티코이드 작동제들은 EZH2 WT 및 돌연변이체 GCB 림프종 주들에 있어서 복합 이익을 나타내었다.

도 7a 내지 7c는, EZH2 돌연변이체 림프종 이종이식편 모델 몇 개에 있어서 화합물 44(Cpd44)-CHOP 조합 적용이 단일 제제가 투여되었을 때에 비하여 증가된 항종양 활성을 나타내는 것을 입증하는 일련의 플롯들이다. WSU-DLCL2(EZH2 Y646F) 이종이식편들은 방법들에 지정된 바와 같이 화합물 44, CHOP, 또는 이것들의 조합으로 28 일 동안 처리되었다(도 7a). 평균 종양 부피 +/- SEM이 플롯으로 작성되었다. 화합물 44 용량 150 mg/kg TID 및 225 mg/kg BID 둘 다는 비이를 단독 용량 상기만큼보다 종양 성장 억제에 있어 통계학적으로 더 유의적이었다 (*p값 < 0.05). 225 mg/kg BID만큼의 화합물 44와 CHOP가 적용되는 처리는 임의의 단일 제제 단독 처리보다 더 큰 종양 퇴행을 초래하였다(**p값 <0.001 대 비이를). 통계 결과들은 반복된 측정치 ANOVA에 의해 산정되었다. SU-DHL6(EZH2 Y646N) 이종이식편은 방법들에 지정된 바와 같이 화합물 44, CHOP 또는 이것들의 조합으로 28 일 동안 처리되었다(도 7b). 평균 종양 부피 +/- SEM이 맨위 패널에 플롯으로 작성되었다. CHOP 또는 단일 제제 화합물 44 단독은 종양 성장에 어떠한 영향도 미치지 않았지만, 225 mg/kg BID만큼의 화합물 44와 CHOP가 함께 적용된 처리는 28 일의 처리 기간 동안에 종양 성장 퇴행을 초래하였는데, 다만 이때 종양 성장 지연은 35 일간의 투여 중지 이후에 유지되었다(*p값<0.0001). 60 일에 걸친 생존 곡선들(아래 패널)은, 화합물 44와 CHOP가 조합되어 처리된 동물들에서 유의적 종양 성장 지연을 나타내고 있다(**p값<0.05). 통계 결과들은 양측 꼬리 검정 (two-tailed t-test)에 의해 산정되었다. SUDHL-10(EZH2 Y646F) 이종이식편들은 방법들에 지정된 바와 같이 화합물 44, COP(독소루비신 성분 불포함 SOC) 또는 이것들의 조합으로 28 일 동안 처리되었다(도 7c). 평균 종양 부피 +/- SEM은 맨위 패널에 플롯으로 작성되었다. 종양 성장 지연 연구 60 일에 걸친 생존율(%)은 중간 패널에

플롯으로 작성되었다(주의: 500 mg/kg 및 250 mg/kg +COP 생존 곡선들은 중첩됨). 평균 종양 무게들은 맨아래 패널에 비교되어 있는데, 이는 그룹들 간 종양 무게에 유의적 차이가 있음을 나타내고 있다(*p값 < 0.05, ** p값 < 0.01, ****p값 < 0.0001).

도 8의 A 내지 C는, 다양한 세포주들이 화합물 44, 프레드니솔론, 이 화합물 44와 프레드니솔론의 조합, 또는 DMSO로 처리될 때, 글루코코르티코이드 표적 유전자 세스트린 1(SESN1, 도 8의 A), TNF(도 8의 B) 및 GILZ(도 8의 C)의 발현 수준 변화를 나타내는 패널들이다. 도 8의 A 내지 C에 나타낸 바와 같이, 공동 처리 후에는 화합물 44 또는 프레드니솔론 중 어느 하나만이 단독 처리된 후에 비하여 세스트린 1, TNF 및 GILZ의 발현 수준 증가가 관찰되었다.

도 9a 내지 도 9d는 전반적인 H3K27 아세틸화 및 트리메틸화가 프레드니솔론 또는 조합 처리에 의해 영향받지 않음을 나타내는 패널들이다. 세포들은 4 일 동안, 프레드니솔론, 화합물 44(Cpd44), 또는 프레드니솔론과 화합물 44의 조합(프레드니솔론의 용량은 일정하게 유지함)의 용량을 늘려가면서 이것들로 처리되었다. 산 추출된 히스톤은 H3K27Me3 수준들에 대해 ELISA에 의하여 분석되었다(도 9a)(프레드니솔론 단독 처리, 좌측 패널; 화합물 44/프레드니솔론 조합 처리, 우측 패널; IC₅₀값들은 각 그래프의 주석으로서 제공됨). 프레드니솔론 처리에 있어서 H3K27Me3값들은, 본 화합물이 사용되어 관찰되는 용량 의존적 변화들이 존재하지 않았던 것으로서, 막대 그래프로 제시되어 있다. WSU-DLCL2(도 9b), OCI-LY19(도 9c) 또는 RL(도 9d) 세포들은 4 일 동안 프레드니솔론, 화합물 44, 또는 화합물 44와 프레드니솔론의 조합(다만 프레드니솔론의 용량은 일정하게 유지함)의 양을 늘려가면서 이것들로 처리되었다. 산 추출된 히스톤은 H3K27 아세틸화 수준들에 대해 웨스턴 블로트에 의하여 분석되었다.

도 10은 화합물 44 또는 프레드니솔론 중 어느 하나가 사용되는 단일 제제 처리는 SMARCB1 단백질 수준에 어떠한 영향도 미치지 않음을 나타내는 웨스턴 블럿 결과이다.

도 11의 A 및 D는 화합물 44와 에베로리무스의 복합 이익을 나타내는 Fa-CI 플롯들이다. 도 11의 B 및 E는, 화합물 44, 에베로리무스, 화합물 44와 에베로리무스의 조합, 또는 DMSO로 처리된 WSU-DLCL2 세포 및 SU-DHL-5 세포에서 세포자살을 나타내는 패널들이다. 도 11의 C 및 F는, WSU-DLCL2 세포 및 SU-DHL-5 세포 둘 다에서 화합물 44만이 단독으로 처리되었을 때와 비교되는, 화합물 44와 에베로리무스가 공동 처리되었을 때 관찰되는, 세포주기 중 G1기에서의 변화들을 보여주는 플롯들이다. WSU-DLCL2 세포 및 SU-DHL-5 세포 둘 다에서 화합물 44와 에베로리무스 조합에 대해 강력한 상승효과들이 관찰되었다(도 11의 A 및 D).

도 12의 A 및 D는 화합물 44와 이브루티닙의 복합 이익을 나타내는 Fa-CI 플롯들이다. 도 12의 B 및 E는 화합물 44, 이브루티닙, 화합물 44와 이브루티닙의 조합, 또는 DMSO로 처리된 WSU-DLCL2 세포 및 SU-DHL-5 세포에서의 세포자살을 나타내는 패널이다. 도 12의 C 및 F는 WSU-DLCL2 세포 및 SU-DHL-5 세포 둘 다에서 화합물 44만이 단독으로 처리되었을 때와 비교되는, 화합물 44와 이브루티닙이 공동 처리되었을 때 관찰되는, 세포주기 중 G1기에서의 변화들을 나타내는 플롯들이다. WSU-DLCL2 세포 및 SU-DHL-5 세포 둘 다에서 화합물 44와 이브루티닙 조합에 대해 강력한 상승효과들이 관찰되었다(도 12의 A 및 D).

도 13의 A, D 및 G는 WSU-DLCL2 세포, SU-DHL-5 세포 및 OCI-LY19 세포에서의 화합물 44 및 MK-2206의 복합 이익을 나타내는 Fa-CI 플롯들이다. 도 13의 B, E 및 H는 화합물 44, MK-2206, 화합물 44와 MK-2206의 조합, 또는 DMSO로 처리된 WSU-DLCL2 세포, SU-DHL-5 세포 및 OCI-LY19 세포에서의 세포자살을 나타내는 패널이다. 도 13의 C, F 및 I는 상기 3 개의 세포주들에서 화합물 44만이 단독으로 처리되었을 때와 비교되는, 화합물 44와 MK-2206이 공동 처리되었을 때 관찰되는, 세포주기 중 G1기에서의 변화들을 나타내는 플롯들이다. WSU-DLCL2 세포, SU-DHL-5 세포 및 OCI-LY19 세포에서 화합물 44와 MK-2206의 조합에 대해 강력한 상승효과들이 관찰되었다(도 13의 A, D 및 G).

도 14의 A 내지 C는, WSU-DLCL2 세포 및 SU-DHL-5 세포가 화합물 44, 이브루티닙, MK-2206, 화합물 44와 이브루티닙의 조합, 또는 화합물 44와 MK-2206의 조합으로 처리되었을 때, EGR1, FOS, TCL1, AICDA 및 GJA1의 유전자 발현 변화를 보여주는 막대 그래프이다. EGR1(40 배) 및 FOS(4 배)의 하향조절과, AICDA(3 배), TCL1A(5 배) 및 GJA1(3 배)의 상향조절은 단일 제제 단독 처리시보다 화합물 44와 제2 제제의 조합이 처리되었을 때 관찰되었다(도 14의 A 내지 C).

도 15는 신호전달 경로 내 다양한 화학 요법 제제들의 표적들과 범발성 대형 B 세포 림프종(DLBCL) 생물학에 연루된 신호전달 경로들에 관한 도해이다.

도 16의 A 및 D는, WSU-DLCL2 세포 및 SU-DHL-5 세포가 화합물 44, 에베로리무스, 화합물 44와 에베로리무스의

조합, 그리고 DMSO로 처리된 후에 관찰되는, 세포주기 중 G1기에서의 변화들을 나타내는 플롯들이다. 도 16의 B 및 E는 WSU-DLCL2 세포 및 SU-DHL-5 세포가 화합물 44, 에베로리무스, 화합물 44와 에베로리무스의 조합, 그리고 DMSO로 처리되었을 때 관찰되는, 세포주기 중 S기에서의 변화들을 나타내는 플롯들이다. 도 16의 C 및 F는 WSU-DLCL2 세포 및 SU-DHL-5 세포가 화합물 44, 에베로리무스, 화합물 44와 에베로리무스의 조합, 그리고 DMSO로 처리되었을 때 관찰되는, 세포주기 중 G2/M기에서의 변화들을 나타내는 플롯들이다. SU-DHL-5 세포들에 조합 처리된 후 48 시간 경과시에는 세포주기 중 G1, S 및 G2/M 기 각각에 있는 세포들의 상승적 감소가 나타낸다(도 16의 D 내지 F). WSU-DLCL2 세포들이 단일 제제 처리 또는 조합 처리되었을 때 세포주기 중 서브 G1기에서는 어떠한 변화도 관찰되지 않았다(도 16의 A). WSU-DLCL2 세포가 조합으로 처리되었을 때, 세포주기 중 S기 및 G2/M 기 각각에 있는 세포들의 시간 의존 상승적 감소가 관찰되었다(도 16의 B 및 C).

도 17의 A 및 D는, WSU-DLCL2 세포 및 SU-DHL-5 세포가 화합물 44, 이브루티닙, 화합물 44와 이브루티닙의 조합, 그리고 DMSO로 처리되었을 때 관찰되는, 세포주기 중 G1기에서의 변화들을 나타내는 플롯들이다. 도 17의 B 및 E는 WSU-DLCL2 세포들 및 SU-DHL-5 세포들이 화합물 44, 이브루티닙, 화합물 44와 이브루티닙의 조합, 그리고 DMSO로 처리되었을 때 관찰되는, 세포주기 중 S기에서의 변화들을 나타내는 플롯들이다. 도 17의 C 및 F는 WSU-DLCL2 및 SU-DHL-5 세포들이 화합물 44, 이브루티닙, 화합물 44와 이브루티닙의 조합, 그리고 DMSO로 처리되었을 때 관찰되는, 세포주기 중 G2/M기에서의 변화들을 나타내는 플롯들이다. 도 17의 A 내지 F는, WSU-DLCL2 세포 및 SU-DHL-5 세포가, 화합물 44 또는 이브루티닙이 단일 제제로서 처리되었을 때와 비교되는, 이 화합물 44 또는 이브루티닙으로 공동 처리된 후 24시간 경과시 세포주기 중 G1, S 및 G2/M 각각에 있는 세포들의 상승적 감소를 나타낸다.

도 18의 A, D 및 G는, WSU-DLCL2 세포, SU-DHL-5 세포 및 OCI-LY19 세포가 화합물 44, MK-2206, 화합물 44와 MK-2206의 조합, 그리고 DMSO로 처리된 후에 관찰되는, 세포주기 중 G1기에서의 변화들을 나타내는 플롯들이다. 도 18의 B, E 및 H는 WSU-DLCL2 세포, SU-DHL-5 세포 및 OCI-LY19 세포가 화합물 44, MK-2206, 화합물 44와 MK-2206의 조합, 그리고 DMSO로 처리되었을 때 관찰되는, 세포주기 중 S기에서의 변화들을 나타내는 플롯들이다. 도 18의 C, F 및 I는 WSU-DLCL2 세포, SU-DHL-5 세포 및 OCI-LY19 세포가 화합물 44, MK-2206, 화합물 44와 MK-2206의 조합, 그리고 DMSO로 처리되었을 때 관찰되는, 세포주기 중 G2/M기에서의 변화들을 나타내는 플롯들이다. 도 18의 A 내지 I는, WSU-DLCL2 세포 및 SU-DHL-5 세포가, 화합물 44 또는 MK-2206이 단일 제제로서 처리되었을 때와 비교되는, 이 화합물 44 및 MK-2206으로 공동 처리되었을 때에 세포주기 중 G1, S 및 G2/M 각각에 있는 세포들의 상승적 감소를 나타낸다.

도 19는, 화합물 44, 프레드니솔론, 화합물 44와 프레드니솔론의 조합, 또는 DMSO로 처리된 EZH2 야생형(OCI-LY19, DOHH2), EZH2 Y646-감수성(WSU-DLCL2, SUDHL10), 그리고 EZH2 Y646-내성(RL, SUDHL) 세포주들에 대해서, 글루코코르티코이드 수용체의 발현 수준의 변화(DMSO 대조군에 대해 정규화됨)를 나타내는 막대 그래프이다. 배수 변화값들은 컴Ct 방법이 사용되고, 참고 유전자로서는 ACTB, B2M 및 GAPDH 가 사용되어 정량되었다. 결과들이 나타내는 바와 같이, 글루코코르티코이드 수용체들의 발현 수준들은 조합 처리시 세포주들 간에 통상 영향받지 않았다.

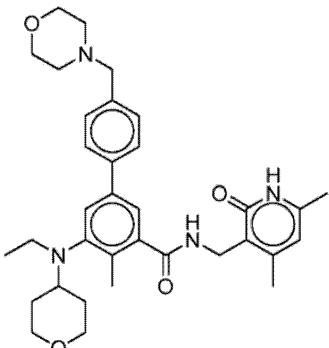
도 20의 A 내지 C는 이종이식편 보유 마우스에서 진행된 CHOP 치료계획에서 1 개 또는 모든 화학요법 성분들이 배제되었을 때의 효과들을 보여주는 것이다. 도 20의 A는, 화합물 44, COP(독소루비신 성분을 포함하지 않는 화학요법) 또는 이것들의 조합이 28 일 동안 처리/적용되었을 때 SUDHL10(EZH2 Y646F) 이종이식편 보유 마우스에서 종양 무게 변화들을 나타내는 플롯이다. 도 20의 B는 화합물 44, 프레드니솔론 또는 이것들의 조합 2 회 용량으로 28 일 동안 처리되었을 때 SUDHL10(EZH2 Y646F) 이종이식편 보유 마우스에서 종양 무게 변화들을 나타내는 플롯이다. 도 20의 C는 화합물 44, 프레드니솔론 또는 이것들의 조합이 처리되었을 때 SUDHL10(EZH2 Y646F) 이종이식편 보유 마우스의 체중 변화들을 나타내는 플롯이다(도 20의 B 참조). 최대 허용 용량의 화합물 44 또는 화합물 44/COP 조합이 투여/적용된 마우스는 60 일 경과시 100% 생존율을 나타내었고, 최대 허용 용량의 화합물 44 처리 그룹을 비롯하여 기타 모든 처리 그룹들 중 조합 투여 그룹은 28 일 경과시 최소 종양 무게를 나타내었다(도 20의 A). 프레드니손 단독 투여는 어떠한 유의적 항종양 효과도 유도하지 않았다(도 20의 B). 앞선 연구와 병행하여 화합물 44가 투여되었을 경우에는 오로지 부분 응답만을 나타냈으나, 프레드니손 투여계획 2 회차 진행시가 아닌 화합물 44와 프레드니손의 공동 투여시에는 화합물 44가 단독으로 최대 용량만큼 투여될 때 달성되는 최대 가능 퇴행(maximal possible regression)이 유도되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

본 발명은 적어도 부분적으로는, 화합물 44가, EZH2 돌연변이 상태와는 상관없이, 현재 사용되고 있는 치료 기

준을 비롯한 다양한 제제와 조합되어 임의의 암을 치료함에 있어 매우 유효하다는 발견을 기반으로 하고 있다. 특정 구현예에서, 암은 림프종이다. 특정 구현예에서, 암은 배 중심 B 세포(GCB) 기원의 범발성 대형 B 세포 림프종(DLBCL) 또는 비호지킨 림프종(NHL)이다. 특정 구현예들에서, 림프종은 EZH2 돌연변이체 림프종이다. 특정 구현예들에서, 림프종은 EZH2 비 돌연변이체 림프종 또는 EZH2 야생형 림프종이다.

[0031] 본 발명의 특정 양태들에서, EZH2 억제제는 하기 화학식을 가지는 화합물 44(EPZ-6438, E7438이라고도 알려짐) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이다:



[0032]

본 발명은, 종양이 EZH2 히스톤 메틸기전이효소 억제제 또는 항암제가 단독 처리되어 달성되는 결과보다 월등한 결과를 달성하면서, EZH2 히스톤 메틸기전이효소 억제제와 기타 항암제가 임의의 종양을 치료하는데 조합되어 사용될 수 있다는 발견을 기반으로 한다. 그러므로, 본 발명은 EZH2 히스톤 메틸기전이효소 억제제와 1 개 이상의 기타 치료제를 포함하는 조성물, 그리고 진행 과정이 히스톤 또는 기타 단백질의 메틸화 상태 조정에 의해 영향을 받을 수 있는 질병(예를 들어, 암)을 치료하는데 있어서 상기 조성물의 사용 방법을 제공한다. 특정 구현예에서, 본 발명은 화합물 44 및 프레드니손을 포함하는 조성물을 특징으로 한다. 본 발명은 또한 암, 예를 들어 여포성 림프종(FL) 및 범발성 세포 대형 B 세포 림프종(DCLBL)을 치료하기 위한, EZH2 히스톤 메틸기전이효소 억제제 및 1 개 이상의 치료제, 예를 들어 화합물 44 및 프레드니손을 포함하는 병용 요법의 방법을 포함하기도 한다. 구체적으로 본 발명의 방법은 암을 치료 또는 예방하거나, 암 세포 증식을 억제하는데 유용하다.

[0034]

본 발명의 하나의 양태는, 돌연변이체 EZH2를 발현하는 피험체에 치료학적 유효량의 EZH2 억제제와 1 개 이상의 기타 치료제를 투여함으로써 피험체 내에서 암 또는 전암성 병태의 증상을 치료 또는 완화하기 위한 방법에 관한 것이다. 본 발명의 돌연변이체 EZH2는, 돌연변이체 EZH2 폴리펩티드 또는 이 돌연변이체 EZH2 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 지칭한다. 특정 구현예에서, 돌연변이체 EZH2는 자체의 기질 포켓 도메인에 1 개 이상의 돌연변이를 포함한다.

[0035]

본 발명의 다른 양태는, 돌연변이체 EZH2 또는 야생형 EZH2를 발현하는 피험체에 치료학적 유효량의 EZH2 억제제와 1 개 이상의 기타 치료제를 투여함으로써 피험체 내에서 암 또는 전암성 병태의 증상을 치료 또는 완화하기 위한 방법에 관한 것이다. 본 발명의 돌연변이체 EZH2는, 돌연변이체 EZH2 폴리펩티드 또는 돌연변이체 EZH2 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 지칭한다. 특정 구현예들에서, 돌연변이체 EZH2는 자체의 기질 포켓 도메인에 1 개 이상의 돌연변이를 포함한다.

[0036]

다른 양태에서, 본 발명은 돌연변이체 EZH2 또는 야생형 EZH2를 발현하는 피험체에 치료학적 유효량의 EZH2 억제제, 예를 들어 화합물 44와 1 개 이상의 글루코코르티코이드 수용체 작동제(GRag), 예를 들어 프레드니손, 프레드니솔론 또는 텍사메타손을 투여함으로써 피험체 내에서 암 또는 전암성 병태의 증상을 치료 또는 완화하기 위한 방법에 관한 것이다. 본 발명의 돌연변이체 EZH2는 돌연변이체 EZH2 폴리펩티드 또는 이 돌연변이체 EZH2 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 지칭한다. 특정 구현예들에서, 돌연변이체 EZH2는 자체의 기질 포켓 도메인에 1 개 이상의 돌연변이를 포함한다.

[0037]

인간 EZH2 핵산 및 폴리펩티드는 이미 기술된 바 있다. 예를 들어 각각이 본원에 그 자체로서 참고문헌으로 인용되어 있는 문헌 및 입수처[Chen et al. (1996) *Genomics* 38:30-7 [746 개 아미노산]; Swiss-Prot 승인번호 Q15910 [746 아미노산]; GenBank 승인번호 NM_004456 및 NP_004447(동형체 a[751 개 아미노산]); 및 GenBank 승인번호 NM_152998 및 NP_694543(동형체 b [707 개 아미노산])]를 참조한다.

[0038]

본 출원을 위해 인간 EZH2의 아미노산 잔기 Y641은 Swiss-Prot 승인번호 Q15910의 Y641이거나 이에 상응하는 티로신 잔기를 지칭하는 것으로 이해될 것이다.

- [0039] 또한 본 출원을 위해서 인간 EZH2의 Y641 돌연변이체, 그리고 균등하게는 EZH2의 Y641 돌연변이체는 야생형 인간 EZH2의 Y641에 상응하는 아미노산 잔기가 티로신 이외의 아미노산 잔기에 의해 치환된 인간 EZH2를 지칭하는 것으로 이해될 것이다.
- [0040] 특정 구현예들에서, R-CHOP는 CHOP의 GRag 성분인 프레드니솔론 또는 텍사메타손이다. 특정 구현예들에서, B 세포 수용체(BCR) 신호전달 경로 억제제는 리툭시맙, AKT 억제제 MK-2206, 이델랄리십, 트라메티닙, 타마티닙, 에베로리무스 또는 이브루티닙이다.
- [0041] 본 발명은 부분적으로, PI3K-AKT-mTOR BCR 신호전달 경로 억제제, 예를 들어 이델랄리십, MK-2206 및 에베로리무스가 화합물 44와 조합되어 투여될 때 WSU-DLCL2 세포주 및 SU-DHL-10 세포주 내에서 매우 강력한 상승효과를 유도하였다는 발견을 기반으로 한다. 본 발명은 또한 부분적으로, 화합물 44 및 B 세포 수용체 경로 억제제, 예를 들어 이브루티닙 및 타마티닙의 조합은 상기 돌연변이체 세포주 둘 다에서 매우 강력한 상승효과를 나타내었다는 발견을 기반으로 한다. 특정 구현예들에서, BCL 수용체 억제제는 나보티클락스 또는 ABT-199이다.
- [0042] 몇몇 구현예들에서, 암은 배 중심 B 세포의 비호지킨 림프종, 범발성 대형 B 세포 림프종 또는 비호지킨 림프종이다.
- [0043] 몇몇 구현예들에서, 치료 기준 제제는 R-CHOP, BCL 억제제 및 BCR 억제제로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물 1 개 이상이다.
- [0044] 몇몇 구현예들에서, R-CHOP는 CHOP의 GRag 성분인 프레드니솔론 또는 텍사메타손이다.
- [0045] 몇몇 구현예들에서, BCR 억제제는 리툭시맙, AKT 억제제 MK-2206, 이델랄리십, 트라메티닙, 타마티닙, 에베로리무스 또는 이브루티닙이다.
- [0046] 몇몇 구현예들에서, 암은 EZH2 돌연변이체 암이다.
- [0047] 몇몇 구현예들에서, 암은 EZH2 억제제 내성 또는 난치성 암이다.
- [0048] 하나의 구현예에서, EZH2의 Y641 돌연변이체 아미노산 서열은, 오로지 야생형 인간 EZH2의 Y641에 상응하는 단일 아미노산 잔기의, 티로신 이외의 아미노산 잔기에 의한 치환으로 말미암아, 야생형 인간 EZH2의 아미노산 서열과 상이하다.
- [0049] 하나의 구현예에서, EZH2의 Y641 돌연변이체 아미노산 서열은, 오로지 야생형 인간 EZH2의 Y641에 상응하는 단일 아미노산 잔기에 대한 폐닐알라닌(F)의 치환으로 말미암아 야생형 인간 EZH2의 아미노산 서열과 상이하다. 본 구현예에 의한 EZH2의 Y641 돌연변이체는 본원에서 Y641F 돌연변이체 또는 균등하게는 Y641F로서 지칭된다.
- [0050] 하나의 구현예에서, EZH2의 Y641 돌연변이체 아미노산 서열은, 오로지 야생형 인간 EZH2의 Y641에 상응하는 단일 아미노산 잔기에 대한 히스티딘(H)의 치환으로 말미암아 야생형 인간 EZH2의 아미노산 서열과 상이하다. 본 구현예에 의한 EZH2의 Y641 돌연변이체는 본원에서 Y641H 돌연변이체 또는 균등하게는 Y641H로서 지칭된다.
- [0051] 하나의 구현예에서, EZH2의 Y641 돌연변이체 아미노산 서열은, 오로지 야생형 인간 EZH2의 Y641에 상응하는 단일 아미노산 잔기에 대한 아르기닌(N)의 치환으로 말미암아 야생형 인간 EZH2의 아미노산 서열과 상이하다. 본 구현예에 의한 EZH2의 Y641 돌연변이체는 본원에서 Y641N 돌연변이체 또는 균등하게는 Y641N으로서 지칭된다.
- [0052] 하나의 구현예에서, EZH2의 Y641 돌연변이체 아미노산 서열은, 오로지 야생형 인간 EZH2의 Y641에 상응하는 단일 아미노산 잔기에 대한 세린(S)의 치환으로 말미암아 야생형 인간 EZH2의 아미노산 서열과 상이하다. 본 구현예에 의한 EZH2의 Y641 돌연변이체는 본원에서 Y641S 돌연변이체 또는 균등하게는 Y641S로서 지칭된다.
- [0053] 하나의 구현예에서, EZH2의 Y641 돌연변이체 아미노산 서열은, 오로지 야생형 인간 EZH2의 Y641에 상응하는 단일 아미노산 잔기에 대한 시스테인(C)의 치환으로 말미암아 야생형 인간 EZH2의 아미노산 서열과 상이하다. 본 구현예에 의한 EZH2의 Y641 돌연변이체는 본원에서 Y641C 돌연변이체 또는 균등하게는 Y641C로서 지칭된다.
- [0054] 하나의 구현예에서, EZH2의 A677 돌연변이체 아미노산 서열은, 오로지 야생형 인간 EZH2의 A677에 상응하는 단일 아미노산 잔기에 대한 비 알라닌 아미노산, 바람직하게는 글리신(G)의 치환으로 말미암아 야생형 인간 EZH2의 아미노산 서열과 상이하다. 본 구현예에 의한 EZH2의 A677 돌연변이체는 본원에서 A677 돌연변이체, 바람직하게는 A677G 돌연변이체, 또는 균등하게는 A677G로서 지칭된다. A677은 또한 A682라 지칭되기도 한다.
- [0055] 하나의 구현예에서, EZH2의 A687 돌연변이체 아미노산 서열은, 오로지 야생형 인간 EZH2의 A687에 상응하는 단일 아미노산 잔기에 대한 비 알라닌 아미노산, 바람직하게는 발린(V)의 치환으로 말미암아 야생형 인간 EZH2의

아미노산 서열과 상이하다. 본 구현예에 의한 EZH2의 A687 돌연변이체는 본원에서 A687 돌연변이체, 바람직하게는 A687V 돌연변이체, 또는 균등하게는 A687V로서 지칭된다. A687은 또한 A692라 지칭되기도 한다.

[0056] 하나의 구현예에서, EZH2 돌연변이체의 아미노산 서열은 야생형 인간 EZH2의 아미노산 서열과, 자체의 기질 포켓 도메인의 아미노산 잔기 1 개 이상만큼 상이하다. 본 구현예에 의한 EZH2의 돌연변이체는 본원에서 EZH2 돌연변이체로서 지칭된다.

[0057] 기타 예시적 치환 아미노산 돌연변이는 677번, 687번 또는 641번 아미노산 위치에서의 치환, 예를 들어 677번 아미노산 위치에서 야생형 잔기 알라닌(A)에 대한 글리신(G)의 치환(A677G); 687번 아미노산 위치에서 야생형 잔기 알라닌(A)에 대한 발린(V)의 치환(A687V); 641번 아미노산 위치에서 야생형 잔기 티로신(Y)에 대한 페닐알라닌(F)의 치환(Y641F); 641번 아미노산 위치에서 야생형 잔기 티로신(Y)에 대한 히스티딘(H)의 치환(Y641H); 641번 아미노산 위치에서 야생형 잔기 티로신(Y)에 대한 아스파라긴(N)의 치환(Y641N); 641번 아미노산 위치에서 야생형 잔기 티로신(Y)에 대한 세린(S)의 치환(Y641S); 또는 641번 아미노산 위치에서 야생형 잔기 티로신(Y)에 대한 시스테인(C)의 치환(Y641C)(이에 한정되는 것은 아님)을 포함한다. Y641은 또한 Y646이라고 지칭되기도 한다.

[0058] EZH2에 대해 이형접합성인 세포들은, WT 효소에 의한 H3-K27me1의 효율적 형성과, 돌연변이체 효소 형태(들)에 의한 부모 종의 H3-K27me2, 특히 H3-K27me3로의 효율적 후속 전이로 말미암아, 악성 표현형을 보일 것으로 예상될 것이다.

[0059] 본 발명의 다른 양태는 피험체 내 H3-K27의 삼메틸화된 H3-K27로의 전환을 억제하기 위한 방법이다. 상기 억제는 피험체 내 메틸화되지 않은 H3-K27의 일메틸화된 H3-K27로의 전환, 일메틸화된 H3-K27의 이메틸화된 H3-K27로의 전환, 이메틸화된 H3-K27의 삼메틸화된 H3-K27로의 전환, 또는 이것들의 임의의 조합, 예를 들어 일메틸화된 H3-K27의 이메틸화된 H3-K27로의 전환과, 이메틸화된 H3-K27의 삼메틸화된 H3-K27로의 전환을 수반할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 "메틸화되지 않은 H3-K27"이란, 메틸기가 27번 리신의 아미노기에 공유 결합되지 않은 히스톤 H3을 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같은 "일메틸화된 H3-K27"이란, 하나의 메틸기가 27번 리신의 아미노기에 공유 결합된 히스톤 H3을 지칭한다. 일메틸화된 H3-K27은 또한 본원에서 H3-K27me1이라 칭하여지기도 한다. 본원에 사용된 바와 같은 "이메틸화된 H3-K27"이란, 2 개의 메틸기가 27번 리신의 아미노기에 공유 결합된 히스톤 H3을 지칭한다. 이메틸화된 H3-K27은 또한 본원에서 H3-K27me2라 칭하여지기도 한다. 본원에 사용된 바와 같은 "삼메틸화된 H3-K27"이란, 3 개의 메틸기가 27번 리신의 아미노기에 공유 결합된 히스톤 H3을 지칭한다. 삼메틸화된 H3-K27은 또한 본원에서 H3-K27me3라 칭하여지기도 한다. 본 발명의 조성물은 화합물 44 와, 기타 치료제 1 개 이상을 포함한다. 본 발명의 화합물과 조합은, 동시에, 순차적으로 또는 교대로 투여 또는 수행되기 적당한 1 개 이상의 기타 치료제 또는 치료 방법과의 병용 요법 또는 병행 요법의 일환으로서 투여 되기에 적당하다. 본 발명의 방법에 적당한 다른 화합물들은 미국 특허출원 공개 20120264734에 기술되어 있다.

[0060] 본 발명의 특정 구현예에서, EZH2의 억제제는, 이것이 야생형 EZH2의 히스톤 메틸기전이효소 활성을 억제하는 것보다 더 효율적으로 돌연변이체 EZH2의 히스톤 메틸기전이효소의 활성을 억제할 때, 돌연변이체 EZH2의 히스톤 메틸기전이효소 활성을 "선택적으로 억제"한다. 예를 들어 하나의 구현예에서, 선택적 억제제는 돌연변이체 EZH2에 대한 IC50이 야생형 EZH2에 대한 IC50보다 적어도 40% 낮다. 하나의 구현예에서, 선택적 억제제는 돌연변이체 EZH2에 대한 IC50이 야생형 EZH2에 대한 IC50보다 적어도 50% 낮다. 하나의 구현예에서, 선택적 억제제는 돌연변이체 EZH2에 대한 IC50이 야생형 EZH2에 대한 IC50보다 적어도 60% 낮다. 하나의 구현예에서, 선택적 억제제는 돌연변이체 EZH2에 대한 IC50이 야생형 EZH2에 대한 IC50보다 적어도 70% 낮다. 하나의 구현예에서, 선택적 억제제는 돌연변이체 EZH2에 대한 IC50이 야생형 EZH2에 대한 IC50보다 적어도 80% 낮다. 하나의 구현예에서, 선택적 억제제는 돌연변이체 EZH2에 대한 IC50이 야생형 EZH2에 대한 IC50보다 적어도 90% 낮다.

[0061] 본 발명의 특정 양태들에서, 억제제는 H3-K27me2의 H3-K27me3로의 전환을 억제한다. 하나의 구현예에서, 억제제는 H3-K27의 삼메틸화를 억제한다고 한다. H3-K27me1의 H3-K27me2로의 전환은 H3-K27me2의 H3-K27me3로의 전환에 선행하므로, H3-K27me1의 H3-K27me2로의 전환 억제제는 자연적으로 H3-K27me2의 H3-K27me3로의 전환을 억제하기도 하는데, 즉 상기 억제제는 H3-K27의 삼메틸화를 억제한다. H3-K27me1의 H3-K27me2로의 전환이 억제되지 않고서도 H3-K27me2의 H3-K27me3로의 전환이 억제될 수도 있다. 이와 같은 유형의 억제는 또한 H3-K27의 이메틸화를 억제하지 않고서도 H3-K27의 삼메틸화 억제를 초래하기도 할 것이다.

[0062] 하나의 구현예에서, 억제제는 H3-K27me1의 H3-K27me2로의 전환과 H3-K27me2의 H3-K27me3로의 전환을 억제한다. 이러한 억제제는 H3-K27me1의 H3-K27me2로의 전환만을 직접 억제할 수 있다. 대안적으로 이러한 억제제는 H3-K27me1의 H3-K27me2로의 전환과 H3-K27me2의 H3-K27me3로의 전환 둘 다를 직접 억제할 수 있다.

- [0063] 본 발명의 특정 양태들에서, 억제제 화합물은 히스톤 메틸기전이효소 활성을 억제한다. 히스톤 메틸기전이효소 활성의 억제는 임의의 적당한 방법이 이용되어 확인될 수 있다. 억제는, 예를 들어 히스톤 메틸기전이효소 활성의 비율의 관점에서 측정될 수 있거나, 아니면 히스톤 메틸기전이효소 활성의 산물로서 측정될 수 있다.
- [0064] 억제는 적당한 대조군의 억제와 비교되어 측정 가능한 억제이다. 하나의 구현예에서, 억제는 적당한 대조군의 억제와 비교되었을 때 적어도 10%의 억제이다. 다시 말해서, 억제제가 존재할 때의 효소적 활성 비율 또는 산물의 양은, 억제제가 존재하지 않을 때의 상기와 상응하는 비율 또는 양의 90% 이하이다. 다양한 기타 구현예들에서, 억제는 적당한 대조군의 억제에 비교되었을 때 적어도 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90% 또는 95% 억제이다. 하나의 구현예에서, 억제는 적당한 대조군의 억제에 비교되었을 때 적어도 99% 억제이다. 다시 말해서, 억제제가 존재할 때의 효소적 활성 비율 또는 산물의 양은 억제제가 존재하지 않을 때의 상기와 상응하는 비율 또는 양의 1% 이하이다.
- [0065] 본 발명의 조성물은 EZH2 억제제 또는 화합물 44 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염과, 1 개 이상의 기타 치료제 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다. 본 발명은 EZH2 억제제 또는 화합물 44 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염과, 1 개 이상의 기타 치료제 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의, 통합 제제(co-formulation) 또는 별도 제제(separate formulation)로서의 투여를 제공하는데, 여기서 제제의 투여는 동시 투여, 순차적 투여 또는 교대 투여이다. 특정 구현예들에서, 기타 치료제들은 본 발명의 조성물에 의해 치료되는 질병 또는 병태를 치료하는데 유용한 것으로서 당업계에 인식되어 있는 제제일 수 있다. 다른 구현예에서, 기타 치료제는 본 발명의 조성물에 의해 치료되는 질병 또는 병태를 치료하는데 유용한 것으로서 당업계에 인식되어 있지 않은 제제일 수 있다. 하나의 양태에서, 기타 치료제들은 본 발명의 조성물에 유리한 속성을 부여하는 제제(예를 들어, 조성물의 절도에 영향을 미치는 제제)일 수 있다. 본 발명의 조성물에 유리한 속성은, EZH2 억제제 또는 화합물 44와, 1 개 이상의 기타 치료제의 조합으로부터 기인하는 약물동태학적 또는 약력학적 상호작용을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 예를 들어 1 개 이상의 기타 치료제는 항암제 또는 화학요법제일 수 있다. 예를 들어 1 개 이상의 기타 치료제는 글루코코르티코이드일 수 있다. 예를 들어 1 개 이상의 기타 치료제는 프레드니손, 프레드니솔론, 사이클로포스파미드, 빙크리스틴, 독소루비신, 마포스파미드, 시스플라틴, AraC, 에베로리무스, 테시타빈, 텍사메타손, 또는 이것들의 기능성 유사체, 유도체, 전구약물 및 대사산물로부터 선택될 수 있다. 다른 양태에서, 기타 치료제는 프레드니손 또는 이의 활성 대사산물인 프레드니솔론일 수 있다.
- [0066] 이하에 제시된 치료제들은 예시를 위한 목적이지, 본 발명을 제한하고자 하는 것은 아니다. 본 발명은 이하에 나열된 것들로부터 선택되는 기타 치료제 적어도 1 개를 포함한다. 본 발명은 1 개 초과의 기타 치료제, 예를 들어 2 개, 3 개, 4 개 또는 5 개의 기타 치료제를 포함할 수 있으므로, 본 발명의 조성물은 자체의 의도된 기능을 수행할 수 있다.
- [0067] 다른 구현예에서, 기타 치료제는 www.cancer.org/docroot/cdg/cdg_0.asp에 나열된 알킬화제; 항생제; 항대사산물; 해독제; 인터페론; 폴리클로날 또는 모노클로날 항체; EGFR 억제제; HER2 억제제; 히스톤 디아세틸라아제 억제제; 호르몬; 유사분열 억제제; MTOR 억제제; 멀티키나아제 억제제; 세린/트레오닌 키나아제 억제제; 티로신 키나아제 억제제; VEGF/VEGFR 억제제; 탁산 또는 탁산 유도체, 아로마타아제 억제제; 안트라사이클린, 미세소관 표적화 약물, 토포이소머라아제 독소 약물, 분자 표적 또는 효소(예를 들어, 키나아제 또는 단백질 메틸기전이효소)의 억제제, 시티딘 유사체 약물 또는 임의의 화학요법제, 항신생물제 또는 항증식제를 포함하는 군으로부터 선택되는 화학요법제(항신생물제 또는 항증식제라고도 지칭됨)이다.
- [0068] 본 발명은 EZH2 억제제 또는 화합물 44 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염과, 1 개 이상의 기타 치료제를 포함하는 조성물이 질병 또는 암 치료를 필요로 하는 괴형체에 투여되는 병용 요법을 위한 방법을 제공한다. 병용 요법은 또한 증식을 억제하거나 세포 사멸을 유도하기 위해 암 세포에 투여될 수도 있다. 하나의 양태에서, 화합물 44 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은, 화합물 44 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염과, 1 개 이상의 기타 치료제를 포함하는 본 발명의 조성물 투여 이후에 투여된다. 하나의 양태에서, 화합물 44 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은, 화합물 44 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염과, 1 개 이상의 기타 치료제를 포함하는 본 발명의 조성물 투여 이전에 투여된다. 하나의 양태에서, 화합물 44 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 1 개 이상의 기타 치료제 투여 이후에 투여되므로, 이 기타 치료제는 단일 조성물 중에 또는 2 개 이상의 조성물 중에 포함되어, 예를 들어 동시에, 순차적으로 또는 교대로 투여된다. 하나의 양태에서, 화합물 44 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 1 개 이상의 기타 치료제 투여 이전에 투여되므로, 이 기타 치료제는 단일 조성물 중에 또는 2 개 이상의 조성물 중에 포함되어, 예를 들어 동시에, 순차적으로 또는 교대로 투여된

다.

[0069] 하나의 구현예에서, 본 발명의 조성물은 화합물 44 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염과, 1 개 이상의 항암제, 예를 들어 CHOP(사이클로포스파미드, 하이드록시도노루비신, 온코빈 및 프레드니손 또는 프레드니솔론) 또는 R-CHOP(리툭시맙, 사이클로포스파미드, 하이드록시도노루비신, 온코빈, 프레드니손 또는 프레드니솔론)를 포함한다. 하나의 구현예에서, 본 발명의 조성물은 화합물 44 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염과, 프레드니손 또는 프레드니솔론을 포함한다. 본 발명의 방법은, 화합물 44의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염과, 항암제, 즉 CHOP, R-CHOP, 프레드니손 또는 프레드니솔론을 투여하는 병용 요법을 포함한다.

[0070] 특정 구현예들에서, "EZH2 억제제 및 치료 기준 제제를 포함하는 조합"은, 통합제제화되지 않은 치료제들을 투여하는 것을 포함하는 것으로 의도된다.

[0071] 특정 구현예들에서, "병용 요법"은 순차적 방식으로 이와 같은 치료제들을 투여하는 것을 포함하는 것으로 의도되되, 다만 각각의 치료제는 상이한 시간에 투여될뿐만 아니라, 이와 같은 치료제들 또는 이와 같은 치료제들 중 적어도 2 개는 동시 투여되거나, 또는 실질적 동시 투여 방식으로 투여된다. 동시 투여는, 예를 들어 각각의 치료제가 고정된 비율로 담긴 단일 캡슐 또는 치료제들 각각에 대한 단일 캡슐들 다수 개의, 피험체로의 투여에 의해 달성될 수 있다. 각각의 치료제의 순차적 투여 또는 실질적 동시 투여는 임의의 적당한 경로, 예를 들어 경구 투여 경로, 정맥내 투여 경로, 근육내 투여 경로, 그리고 점막 조직을 통한 직접 흡수(이에 한정되는 것은 아님)에 의해 이루어질 수 있다. 치료제들은 동일한 경로에 의하거나 상이한 경로들에 의해 투여될 수 있다. 예를 들어 선택되는 조합의 제1 치료제는 정맥내 주사에 의해 투여될 수 있는 반면에, 이 조합의 다른 치료제들은 경구 투여될 수 있다. 대안적으로, 예를 들어 모든 치료제는 경구 투여될 수 있거나, 또는 모든 치료제는 정맥내 주사에 의해 투여될 수 있다. 치료제는 또한 교대로 투여될 수도 있다.

[0072] 본 발명의 특정 양태들에서, 본 발명의 특징을 이루는 병용 요법들은 질병이나 암 치료에 상승효과를 달성할 수 있다. "상승효과"는 치료제들 조합의 효능이 소정의 제제들 중 임의의 것 하나로 인한 효과들의 합보다 큰 경우로서 정의된다. 상승효과는 또한 화합물들 또는 기타 치료제들 중 임의의 것의 단일 제제로서의 투여에 의해 달성될 수 없는 효과일 수도 있다. 상승효과는 종양 크기 감소에 의한 암 치료 효과, 종양 성장 억제 효과, 또는 피험체의 생존율 증가 효과를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상승효과는 또한 암 세포 자생력 감소, 암 세포 사멸 유도, 그리고 암 세포 성장 억제 또는 지연을 포함할 수도 있다.

[0073] 본 발명의 특정 양태들에서, "병용 요법"은 또한, 추가로 기타 생물학적으로 활성인 성분들 및 비 약물 요법(예를 들어, 수술 또는 방사선 치료)과 함께, 상기 기술된 치료제들의 투여를 포함하기도 한다. 병용 요법이 비 약물 치료를 추가로 포함하는 경우, 이 비 약물 치료는, 치료제와 비 약물 치료 조합의 상호 작용으로부터 유리한 효과가 달성되는 한, 임의의 적당한 시간에 수행될 수 있다. 예를 들어 적당한 경우에 있어서, 유리한 효과는 치료제 투여시 비 약물 치료가 일시적으로(예를 들어, 수 일 또는 심지어 수 주 동안) 배제될 때에도 여전히 달성된다.

[0074] 다른 양태에서, 본 발명의 조성물, 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물은 방사선 요법 수행과 조합되어 투여될 수 있다. 방사선 요법은 또한 본원에 기술된 본 발명의 조성물 및 다른 화학요법제와 조합되어 다중 제제 요법(multiple agent therapy)의 일환으로서 적용될 수도 있다.

[0075] 병용 요법은 2 개 이상의 제제, 예를 들어 화합물 44와 1 개 이상의 기타 치료제(이것들 각각은 제제화되어 별도로 투여됨)의 투여에 의해 달성될 수 있거나, 또는 2 개 이상의 제제의 단일 제제로서의 투여에 의해 달성될 수 있다. 기타 조합들도 또한 병용 요법에 포함된다. 예를 들어 2 개의 제제들은 함께 제제화되어, 제3 제제를 함유하는 별도의 제제와 함께 투여될 수 있다. 병용 요법에 사용되는 2 개 이상의 제제는 동시에 투여될 수 있지만, 꼭 그럴 필요는 없다. 예를 들어 제1 제제(또는 제제들의 조합)의 투여는 제2 제제(또는 제제들의 조합)의 투여에 수 분, 수 시간, 수 일 또는 수 주만큼 선행될 수 있다. 그러므로, 2 개 이상의 제제는 서로 간에 수 분 이내의 간격으로 투여될 수 있거나, 또는 서로 간에 1 시간, 2 시간, 3 시간, 6 시간, 9 시간, 12 시간, 15 시간, 18 시간 또는 24 시간 이내에 투여될 수 있거나, 또는 서로 간에 1 일, 2 일, 3 일, 4 일, 5 일, 6 일, 7 일, 8 일, 9 일, 10 일, 12 일, 14 일 이내에 투여될 수 있거나, 또는 서로 간에 2 주, 3 주, 4 주, 5 주, 6 주, 7 주, 8 주, 9 주 또는 10 주 이내에 투여될 수 있다. 몇몇 경우, 상기 간격들보다 더 긴 간격이 적용될 수도 있다. 다수의 경우 병용 요법에 사용된 제제 2 개 이상은 동시에 환자의 체내에 존재하게 되는 것이 요망되긴 하지만, 반드시 그럴 필요는 없다.

[0076] 본 발명은 또한, 본원에 기술된 질병 또는 병태를 치료 또는 예방하는 용량으로 약학적으로 적당한 운반체 또는

부형제(들)와 혼합된, 화합물 44 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 그리고 본원에 개시된 기타 치료제 1개 이상을 포함하는 약학 조성물을 제공하기도 한다. 본 발명의 약학 조성물은 또한 기타 치료제 투여와 조합되어, 또는 기타 치료 방법들의 수행과 조합되어, 동시에, 순차적으로 또는 교대로 투여될 수도 있다.

[0077] 본 발명의 조성물들의 혼합물들은 또한 간단한 혼합물로서, 또는 적당히 제제화된 약학 조성물에 포함되어 환자에게 투여될 수도 있다. 예를 들어 본 발명의 하나의 양태는 치료학적 유효량의 EZH2 억제제 또는 화합물 44, 또는 이것들의 약학적으로 허용 가능한 염, 수화물, 거울상이성체 또는 입체이성체; 기타 치료제 1개 이상, 그리고 약학적으로 허용 가능한 희석제 또는 운반체를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다.

[0078] "약학 조성물"은 본 발명의 화합물을 함유하는, 피험체에 투여되기 적당한 형태를 가지는 제제이다. 본원에 기술된 바와 같은 화합물 44 및 기타 치료제 1개 이상은 각각 개별적으로 또는 다수의 약학 조성물로서, 활성 성분들의 임의의 조합에 포함되어 제제화될 수 있다. 그러므로 1개 이상의 투여 경로는 각각의 약학 조성물의 투여형을 기반으로 적당히 선택될 수 있다. 대안적으로, 본원에 기술된 화합물 44 및 기타 치료제 1개 이상은 하나의 약학 조성물로서 제제화될 수 있다.

[0079] 하나의 구현예에서, 약학 조성물은 별크 형태 또는 단위 투여형의 형태를 가진다. 단위 투여형은 다양한 형태들, 예를 들어 캡슐, IV 백, 정제, 에어로졸 흡입기상 단일 펌프 또는 바이알 중 임의의 것이다. 조성물의 단위 용량 중 활성 성분(예를 들어, 본원에 개시된 화합물 또는 이의 염, 수화물, 용매화물 또는 이성체의 제제)의 양은 유효량으로서, 관련된 구체적인 치료에 따라서 달라진다. 당업자는, 때때로 환자의 나이와 병태에 따라서 용량에 통상적인 변형이 가하여질 필요가 있음을 이해할 것이다. 용량은 또한 투여 경로에 의존하기도 할 것이다. 다양한 경로들, 예를 들어 경구, 폐, 직장, 비경구, 경피, 피하, 정맥 내, 근육 내, 복막 내, 흡입, 협측, 설하, 흉막 내, 초내 및 비 내 경로 등이 고려된다. 본 발명의 화합물의 국소 투여 또는 경피 투여용 투여형들은 분말, 스프레이, 연고, 페이스트, 크림, 로션, 젤, 용액, 패치 및 흡입제를 포함한다. 하나의 구현예에서, 활성 화합물은 멀균 조건들 하에서 약학적으로 허용 가능한 운반체, 그리고 필요한 임의의 보존제, 완충제 또는 추진제와 혼합된다.

[0080] 본원에 사용된 바와 같은 어구 "약학적으로 허용 가능한"이란, 올바른 의학적 판단 범위내에 있으며, 과도한 독성, 염증, 알레르기 반응 또는 기타 문제나 합병증을 일으키지 않고 인간 및 동물 조직과 접촉되어 사용되기 적당한 화합물, 음이온, 양이온, 재료, 조성물, 운반체 및/또는 투여형이 합리적인 이익/위험 비율(benefit/risk ratio)과 비례하는 경우를 지칭한다.

[0081] "약학적으로 허용 가능한 부형제"란, 일반적으로 생물학적이지 않거나 달리 요망될 때에도 안전하고 무독성인 약학 조성물을 제조하는데 유용한 부형제를 의미하고, 수의학적 용도 및 인간 대상의 약학적 용도로서 허용 가능한 부형제를 포함한다. 본 명세서 및 청구항들에 사용된 "약학적으로 허용 가능한 부형제"는 이와 같은 부형제 1개 및 1개 초과 두가지 경우를 모두 포함한다.

[0082] 본 발명의 약학 조성물은 자체의 의도된 투여 경로와 양립 가능하도록 제제화된다. 투여 경로의 예들은 비경구 경로, 예를 들어 정맥 내, 피내, 피하, 경구(예를 들어, 흡입), 경피(국소) 및 경점막 투여를 포함한다. 비경구, 피내 또는 피하 적용에 사용되는 용액 또는 혼탁액은 다음과 같은 성분들을 포함할 수 있다: 멀균 희석제, 예를 들어 주사용 물, 염수 용액, 불휘발성유, 폴리에틸렌글리콜, 글리세린, 프로필렌글리콜 또는 기타 합성 용매; 항생제, 예를 들어 벤질알코올 또는 메틸파라벤; 항산화제, 예를 들어 아스코르브산 또는 중아항산나트륨; 칼레이트화제, 예를 들어 에틸렌디아민테트라아세트산; 완충제, 예를 들어 아세트산염, 시트르산염 또는 인산염; 그리고 긴장성 조정 제제, 예를 들어 염화나트륨 또는 텍스트로스. pH는 산이나 염기, 예를 들어 염화수소산 또는 수산화나트륨이 사용되어 조정될 수 있다. 비경구 제제는 유리나 플라스틱으로 만들어진 앰플, 일회용 시린지 또는 다수 투여용 바이알에 담길 수 있다.

[0083] 본 발명의 조성물은 현재 화학요법 치료에 사용되는, 널리 공지된 방법들 다수를 통해 피험체에 투여될 수 있다. 예를 들어 암 치료를 위해서 본 발명의 화합물은 종양에 직접 주사될 수 있거나, 혈류나 체강에 주사될 수 있거나, 경구 섭취될 수 있거나, 또는 패치가 사용되어 피부를 통해 적용될 수 있다. 선택되는 용량은 유효한 치료를 구성하는데 충분하되, 다만 허용되지 않는 부작용들을 유발할 정도로 많지는 않아야한다. 질병 병태(예를 들어, 암, 전암 등)의 상태와 환자의 건강은, 바람직하게 치료후 합리적인 기간 동안, 그리고 이와 같은 기간에 걸쳐 밀접하게 모니터되어야 한다.

[0084] 본원에 사용된 용어 "치료학적 유효량"이란, 특정된 질병이나 병태를 치료, 완화 또는 예방하거나, 또는 확인 가능한 치료 효과 또는 억제 효과를 보이기 위한 약학 제제의 양을 지칭한다. 효과는 당업계에 공지된 임의의

분석 방법에 의해 확인될 수 있다. 피험체에 대해 정확한 유효량은 해당 피험체의 체중, 크기 및 건강 상태; 병태의 성질과 정도; 그리고 투여를 위해 선택되는 치료제 또는 치료제의 조합에 따라서 달라질 것이다. 소정의 상황에 대한 치료학적 유효량은, 숙련된 기술 범위 안에 속하는 통상의 실험과 임상의의 판단에 의해 결정될 수 있다. 바람직한 양태에서, 치료될 질병 또는 병태는 암이다. 다른 양태에서, 치료될 질병 또는 병태는 세포 증식성 질환이다.

[0085] 특정 구현예들에서, 조합되어 사용되는 약학적 제제 각각의 치료학적 유효량은 각각의 제제가 단독으로 사용되는 단일 요법과는 대조적으로, 조합 사용될 때 더 적을 것이다. 이와 같이 적은 치료학적 유효량은 치료 계획의 독성을 낮출 수 있었다.

[0086] 임의의 화합물에 대한 치료학적 유효량은 우선, 예를 들어 신생물 세포의 세포 배양 분석법에서, 또는 동물 모델, 보통은 래트, 마우스, 토끼, 개 또는 돼지에서 추산될 수 있다. 상기 동물 모델은 또한 적당한 농도 범위 및 투여 경로를 결정하는데 사용될 수도 있다. 그 다음, 이러한 정보는 인간에 있어서의 유용한 투여 용량 및 투여 경로를 결정하는데 사용될 수 있다. 치료/예방 효능 및 독성, 예를 들어 ED₅₀(모집단의 50%에서 치료학적으로 유효한 용량) 및 LD₅₀(모집단의 50%에 치사적인 용량)은 세포 배양액 또는 실험 동물에서의 표준적 약학 방법들에 의해 측정될 수 있다. 독성 효과와 치료 효과간 용량비는 치료 지수이고, 이는 비율, 즉 LD₅₀/ED₅₀으로 표현될 수 있다. 높은 치료 지수를 보이는 약학 조성물이 바람직하다. 용량은 사용된 투여형, 환자의 감수성 및 투여 경로에 따라서 상기 범위 내에서 다양할 수 있다.

[0087] 용량 및 투여는 활성 제제(들)의 충분한 수준을 제공하고, 원하는 효과를 유지하도록 조정된다. 고려될 수 있는 요소들은 질병 상태의 심각성, 피험체의 전체적 건강 상태, 피험체의 나이, 체중 및 성별, 식습관, 투여 시간 및 투여 횟수, 약물 조합(들), 반응 감수성, 그리고 요법에 대한 관용성/응답을 포함한다. 장기 작용성 약학 조성물은 특정 제제의 반감기와 제거율(clearance rate)에 따라서 3 일 내지 4 일마다, 매 주 또는 2 주에 1 회씩 투여될 수 있다.

[0088] 본 발명의 활성 화합물을 함유하는 약학 조성물은 일반적으로 공지된 방법, 예를 들어 통상의 혼합, 용해, 과립화, 당의정 제조, 분말화, 유화, 피포화, 포집 또는 동결건조 방법으로 제조될 수 있다. 약학 조성물은 활성 화합물들의, 약학적으로 사용될 수 있는 제제로의 가공을 촉진하는 부형제 및/또는 조제를 포함하는 약학적으로 허용 가능한 운반체 1 개 이상이 사용되어, 종래의 방식으로 제제화될 수 있다. 물론 적당한 제제는 선택되는 투여 경로에 의존적이다.

[0089] 주사용으로 적당한 약학 조성물은, 멸균 주사 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말과, 멸균 수용액(수용성인 경우) 또는 분산액을 포함한다. 정맥 내 투여에 적당한 운반체는 생리 염수, 정균수, Cremophor™ EL(BASF, Parsippany, N.J.) 또는 인산염 완충 염수(PBS)를 포함한다. 모든 경우들에 있어서, 조성물은 멸균되어야 하고, 용이하게 주사 가능할 정도의 유체이어야 한다. 조성물은 제조 및 보관 조건 하에서 안정적이어야 하고, 미생물, 예를 들어 박테리아 및 진균의 오염 작용에 대해 보존되어야 한다. 운반체는, 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌글리콜 및 액체 폴리에틸렌글리콜 등), 그리고 이것들의 적당한 혼합물을 함유하는 분산 매질 또는 용매일 수 있다. 적당한 유동도는, 예를 들어 코팅, 예를 들어 레시틴이 사용되고, 분산액의 경우 필요한 입도가 유지되며, 계면활성제가 사용됨으로써 유지될 수 있다. 미생물 활동의 예방은 다양한 항박테리아 제제 및 항진균 제제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산 및 티메로살 등에 의해 달성될 수 있다. 다수의 경우에 등장제, 예를 들어 당, 다가알코올, 예를 들어 만니톨 및 솔비톨, 그리고 염화나트륨이 조성을 중에 포함되는 것이 바람직할 것이다. 주사 가능한 조성물의 흡수 시간 연장은, 조성물에 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들어 일스테아르산알루미늄 및 젤라틴이 포함됨으로써 이루어질 수 있다.

[0090] 멸균 주사 용액은, 필요에 따라서 상기 나열된 성분 1 개 또는 이의 조합과 함께, 필요량만큼의 활성 화합물을 적당한 용매에 혼입한 다음, 멸균 여과함으로써 제조될 수 있다. 일반적으로 분산액은 활성 화합물을, 상기 나열된 것들 중 필요한 기타 성분과 염기성 분산 매질을 함유하는 멸균 비이클에 혼입함으로써 제조된다. 멸균 주사 용액 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 제조 방법은, 미리 멸균 여과한 용액으로부터 원하는 임의의 부가 성분과 활성 성분의 분말을 제조하는 임의의 진공 건조법 및 동결 건조법이다.

[0091] 경구 투여 조성물은 일반적으로 비활성 희석제 또는 약학적으로 허용 가능한 식용 운반체를 포함한다. 이 조성물은 젤라틴 캡슐 내에 담기거나 정제로 압착될 수 있다. 경구 투여 치료제 투여를 위해서 활성 화합물은 부형제와 함께 혼입되어, 정제, 트로키 또는 캡슐의 형태로서 사용될 수 있다. 경구 투여용 조성물은 또한 가글로서 사용되도록 유체 운반체가 사용되어 제조될 수도 있는데, 여기서 이 유체 운반체 중 화합물은 경구 적용되고,

입안에서 획 소리를 내며 가글링된 후 뺄어지거나 삼켜질 수 있다. 약학적으로 양립 가능한 결합체들 및/또는 보조제 재료들이 조성물의 일부로서 포함될 수 있다. 정제, 알약, 캡슐 및 트로키 등은 다음과 같은 성분들 중 임의의 것, 또는 유사한 성질을 가지는 화합물을 함유할 수 있다: 결합제, 예를 들어 미세결정질 셀룰로스, 검트래거칸트 또는 젤라틴; 부형제, 예를 들어 전분 또는 락토스; 봉해제, 예를 들어 알긴산, Primogel 또는 옥수수 전분; 윤활제, 예를 들어 스테아르산마그네슘 또는 Sterotes; 활강제, 예를 들어 콜로이드성 이산화실리콘; 감미제, 예를 들어 수크로스 또는 사카린; 또는 풍미제, 예를 들어 페퍼민트, 살리실산메틸 또는 오렌지향.

[0092] 흡입에 의한 투여를 위하여 화합물은, 적당한 추진제, 예를 들어 가스, 예를 들어 이산화탄소가 담긴 가압 용기나 분배기, 또는 분무기로부터 에어로졸 스프레이의 형태로 전달된다.

[0093] 전신 투여는 또한 경점막 수단이나 경피 수단에 의해 이루어질 수도 있다. 경점막 투여 또는 경피 투여를 위하여 투과할 장벽에 적당한 경피흡수 촉진제가 제제 중에 사용된다. 이러한 경피흡수 촉진제는 일반적으로 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 경점막 투여용 경피흡수 촉진제는 세제, 담즙염 및 후시딘산 유도체를 포함한다. 경점막 투여는 비내 스프레이 또는 좌제를 통해 달성될 수 있다. 경점막 투여를 위해 활성 화합물은 당업계에 일반적으로 공지된 바와 같이 연고, 살브(salve), 겔 또는 크림으로 제제화된다.

[0094] 활성 화합물은, 이 화합물이, 예를 들어 임플란트 및 미세피포화된 운반 시스템을 비롯하여 제어 방출형 제제로서 체내에서 빠르게 없어지는 것을 막아줄, 약학적으로 허용 가능한 운반체들과 함께 제조될 수 있다. 생분해성, 생체적합성 종합체, 예를 들어 에틸렌아세트산비닐, 다가 무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르 및 폴리락트산이 사용될 수 있다. 이러한 제제들을 제조하기 위한 방법들은 당업자들에게 명백할 것이다. 재료들은 또한 Alza Corporation 및 Nova Pharmaceuticals, Inc.로부터 상업적으로 입수될 수 있다. 리포좀 혼탁액(바이러스 항원에 대한 모노클로날 항체들과 함께, 감염된 세포들에 표적화된 리포좀 포함)도 또한 약학적으로 허용 가능한 운반체로서 사용될 수 있다. 이와 같은 혼탁액은 당업자들에게 공지된 방법들, 예를 들어 미국 특허 번호 4,522,811에 기술된 바에 따라서 제조될 수 있다.

[0095] 투여의 용이함과 용량의 균일함을 위해 경구 투여용 또는 비경구 투여용 조성물을 용량 단위형으로서 제제화하는 것이 특히 유리하다. 본원에 사용된 바와 같은 용량 단위형이란, 치료될 피험체에 대한 단위 투여형으로서 적당한 물리적으로 구분된 단위를 지칭하는데; 이와 같은 각각의 단위는 필요한 약학 운반체와 함께, 원하는 치료 효과를 내도록 산정된 소정량의 활성 화합물을 함유한다. 본 발명의 용량 단위형에 관한 설명은 활성 화합물의 독특한 특징들과 달성될 구체적인 치료 효과에 의해 기술되고, 이에 직접적으로 의존한다.

[0096] 치료적 적용에 있어서, 본원에 기술된 EZH2 억제제 화합물, 본원에 기술된 기타 치료제, 화합물 44와 1 개 이상의 기타 치료제를 포함하는 조성물, 또는 본 발명에 따라서 사용되는 약학 조성물의 용량은, 선택되는 용량에 영향을 미치는 다른 어떤 요소들 중에서도, 제제, 투여받는 환자의 나이, 체중 및 임상 상태, 그리고 요법을 적용하는 임상의나 실무자의 경험과 판단에 따라서 달라진다. 일반적으로 용량은 종양의 성장을 늦추고, 바람직하게는 퇴행시킬뿐만 아니라, 바람직하게는 암의 완전한 퇴행을 초래하기에 충분하여야 한다. 용량은 1 일에 약 0.01 mg/kg 내지 약 5000 mg/kg의 범위에 있을 수 있다. 바람직한 양태들에서, 용량은 1 일에 약 1 mg/kg 내지 약 1000 mg/kg의 범위에 있을 수 있다. 하나의 양태에서, 용량은, (환자의 체중(kg), 체표면적(m^2) 및 나이(세)에 따라서 조정될 수 있는) 단일 용량, 분할 용량 또는 연속 용량으로서 약 0.1 mg/일 내지 약 50 g/일; 약 0.1 mg/일 내지 약 25 g/일; 약 0.1 mg/일 내지 약 10 g/일; 약 0.1 mg/일 내지 약 3 g/일; 또는 약 0.1 mg/일 내지 약 1 g/일일 것이다. 약학 제제의 유효량은 임상의나 기타 자격이 있는 관찰자에 의해 주목되는 바와 같이 객관적으로 확인될 수 있는 개선을 제공하는 양이다. 예를 들어 환자에 있어서 종양의 퇴행은 종양의 지름을 참고로 하여 측정될 수 있다. 종양 지름의 감소는 퇴행을 나타낸다. 퇴행은 또한 치료가 중단된 후 종양이 재발되지 않음에 의해서도 나타내어진다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "용량 유효 방식"이란, 활성 화합물의 양이 피험체 또는 세포 내에서 원하는 생물학적 효과를 발휘하는 방식을 지칭한다.

[0097] 약학 조성물은 투여 지침과 함께 용기, 팩 또는 분배기 내에 담길 수 있다.

[0098] 본 발명의 조성물은 추가로 염을 생성할 수 있다. 본 발명의 조성물은 문자당 1 개를 초과하는 염(예를 들어, 일염, 이염, 삼염)을 생성할 수 있다. 이러한 형태 모두는 또한 본 발명의 범위 내에서 고려된다.

[0099] 본원에 사용된 "약학적으로 허용 가능한 염"이란, 본 발명의 화합물의 유도체를 지칭하는데, 여기서 모체 화합물은 이의 산 염 또는 염기 염이 제조됨으로써 변형된다. 약학적으로 허용 가능한 염의 예들은 염기성 잔기, 예를 들어 아민의 무기염 또는 유기산염, 산성 잔기, 예를 들어 카르복실산의 알칼리염 또는 유기염 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 약학적으로 허용 가능한 염은, 예를 들어 무독성 무기산 또는 유기산으로부터

생성된 모체 화합물의 4차 암모늄 염 또는 종래의 무독성 염을 포함한다. 예를 들어 이와 같은 종래의 무독성 염은, 2-아세톡시벤조산, 2-하이드록시에탄설폰산, 아세트산, 아스코르브산, 벤젠설폰산, 벤조산, 중탄산, 탄산, 시트르산, 에데트산, 에탄디설폰산, 1,2-에탄설폰산, 푸마르산, 글루코헵탄산, 글루콘산, 글루탐산, 글리콜산, 글리콜리아르사닐산, 헥실레소르신산, 히드라밤산, 브롬화수소산, 염화수소산, 요오드화수소산, 하이드록시말레산, 하이드록시나프تون산, 이세티온산, 락트산, 락토비온산, 라우릴설폰산, 말레산, 말산, 만델산, 메탄설폰산, 납실산, 질산, 옥살산, 팜산, 판토텐산, 페닐아세트산, 인산, 폴리갈락투론산, 프로피온산, 살리실산, 스테아르산, 2차 아세트산, 숙신산, 설팜산, 설파닐산, 황산, 탄닌산, 타르타르산, 톨루엔설폰산, 그리고 통상적으로 발생하는 아민산, 예를 들어 글리신, 알라닌, 페닐알라닌, 아르기닌 등으로부터 선택되는 무기산 및 유기산으로부터 유래하는 염들을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0100] 약학적으로 허용 가능한 염의 기타 예들은 헥산산, 사이클로펜탄프로피온산, 피루브산, 말론산, 3-(4-하이드록시벤조일)벤조산, 신남산, 4-클로로벤젠설폰산, 2-나프탈렌설폰산, 4-톨루엔설폰산, 캄포설폰산, 4-메틸비사이클로-[2.2.2]-옥트-2-엔-1-카르복실산, 3-페닐프로피온산, 트리메틸아세트산, 3차 부틸아세트산, 뮤콘산 등의 염을 포함한다. 본 발명은 또한 모체 화합물 중에 존재하는 산성 양성자가 금속 이온, 예를 들어 알칼리 금속 이온, 알칼리 토금속 이온 또는 알루미늄 이온에 의해 치환되거나; 또는 유기 염기, 예를 들어 에탄올아민, 디에탄올아민, 트리에탄올아민, 트로메타민 및 N-메틸글루카민 등과 배위결합할 때 생성되는 염을 포함한다.

[0101] 약학적으로 허용 가능한 염들에 대한 모든 언급에는 동일한 염의 용매 부가 형태(용매화물)들이 포함됨이 이해될 것이다.

[0102] 조성물, 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물은 경구, 비 내, 경피, 폐내, 흡입, 협측, 설하, 복막내, 피하, 근육 내, 정맥 내, 직장, 흉막 내, 초 내 및 비경구 투여된다. 하나의 구현예에서, 화합물은 경구 투여된다. 당업자는 임의의 투여 경로의 이점을 인지할 것이다.

[0103] 화합물이 사용되는 용량 치료계획은 다양한 요소들, 예를 들어 환자의 유형, 종, 나이, 체중, 성별 및 의학적 상태; 치료될 병태의 심각성; 투여 경로; 환자의 신장 및 간 기능; 그리고 사용된 구체적 화합물 또는 이의 염에 따라서 선택된다. 보통의 숙련된 전문의 또는 수의사는 상기 병태의 진행을 예방, 방지 또는 막는데 필요한 약물의 유효량을 용이하게 결정하여 처방할 수 있다.

[0104] 본 발명에 개시된 화합물의 제제화 및 투여 기술들은 문헌[*Remington: the Science and Practice of Pharmacy*, 19th edition, Mack Publishing Co., Easton, PA (1995)]에서 발견될 수 있다. 하나의 구현예에서, 본원에 기술된 화합물과 이의 약학적으로 허용 가능한 염은, 약학적으로 허용 가능한 운반체 또는 희석제와 함께 약학 제제 중에 사용된다. 약학적으로 허용 가능한 적당 운반체는 비활성 고체 충전제 또는 희석제, 그리고 멀균 수용액 또는 유기 용액을 포함한다. 화합물은 이와 같은 약학 조성물 중에 본원에 기술된 범위의 원하는 투여량을 제공하기에 충분한 양으로 존재할 것이다.

[0105] 본원에 사용된 모든 백분율과 비율은 달리 지정되지 않는 한 중량부이다. 본 발명의 기타 특징들과 이점들은 상이한 실시예들로부터 분명해진다. 제공된 실시예들은 본 발명을 수행함에 있어서 유용한 방법과 상이한 구성 요소들을 예시한다. 실시예들은 청구된 발명을 제한하지 않는다. 당업자는 본원에 개시된 사항을 기반으로 본 발명을 수행하는데 유용한 방법과 기타 구성 요소들을 인지하여 사용할 수 있다.

[0106] 본 발명은 히스톤과 기타 단백질의 메틸화 상태가 조정됨으로써 그 경과가 영향을 받을 수 있는 질병 및 병태를 치료하기 위한 조성물 및 방법을 제공하는데, 여기서 상기 메틸화 상태는 적어도 부분적으로 EZH2의 활성에 의해 매개된다. 히스톤의 메틸화 상태의 조정은 결과적으로 메틸화에 의해 활성화되는 표적 유전자들, 및/또는 메틸화에 의해 억제되는 표적 유전자들의 발현 수준에 영향을 줄 수 있다. 상기 방법은 이와 같은 치료를 필요로 하는 피험체에 본 발명의 조성물 치료학적 유효량만큼을 투여하거나, 또는 이와 같은 치료를 필요로 하는 피험체에 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0107] 적어도 비정상적 히스톤 메틸화가 임의의 암 및 전암성 병태와 연관되어 있음이 발견되었다는 사실을 기반으로 하였을 때, 피험체 내에서 돌연변이체 EZH2로 암 또는 전암성 병태를 치료하기 위한 방법은, 메틸화를 억제하는 화합물 치료학적 유효량을, 상기 치료를 필요로 하는 피험체에 투여하는 단계를 포함한다. 하나의 구현예에서, 피험체 내에서 암 또는 전암성 병태를 치료하기 위한 방법은, 메틸화되지 않은 H3-K27의 일메틸화된 H3-K27(H3-K27me1)으로의 전환을 억제하는 화합물 치료학적 유효량을, 상기 치료를 필요로 하는 피험체에 투여하는 단계를 포함한다. 하나의 구현예에서, 피험체 내에서 암 또는 전암성 병태를 치료하기 위한 방법은 일메틸화된 H3-K27(H3-K27me1)의 이메틸화된 H3-K27(H3-K27me2)으로의 전환을 억제하는 화합물 치료학적 유효량을, 상기 치료

를 필요로 하는 피험체에 투여하는 단계를 포함한다. 하나의 구현예에서, 피험체 내에서 암 또는 전암성 병태를 치료하기 위한 방법은 H3-K27me2의 삼메틸화된 H3-K27(H3-K27me3)으로의 전환을 억제하는 화합물 치료학적 유효량을, 상기 치료를 필요로 하는 피험체에 투여하는 단계를 포함한다. 하나의 구현예에서, 피험체 내에서 암 또는 전암성 병태를 치료하기 위한 방법은 H3-K27me1의 H3-K27me2로의 전환과 H3-K27me2의 H3-K27me3으로의 전환 둘 다를 억제하는 화합물 치료학적 유효량을, 상기 치료를 필요로 하는 피험체에 투여하는 단계를 포함한다. 메틸화의 질병 특이적 증가는, 히스톤 또는 단백질 메틸화의 세포내 수준의 전반적 증가가 일어나지 않을 때 크로마틴의 핵심 계획상 위치에서 발생할 수 있음을 주목하는 것은 중요하다. 예를 들어 질병 관련 핵심 유전자에서의 이상 과메틸화가 전체 히스톤 또는 단백질 과메틸화의 배경에 거슬러 발생하는 것이 가능하다.

[0108] 메틸화의 조정은 일반적으로 세포 증식을 조정하는데 사용될 수 있다. 예를 들어 몇몇 경우에서 과도한 증식은 메틸화를 감소시키는 제제로 감소될 수 있는 반면에, 불충분한 증식은 메틸화를 증가시키는 제제로 자극될 수 있다. 그러므로, 치료될 수 있는 질병들은 과증식성 질병, 예를 들어 양성 세포 성장과 악성 세포 성장(암)을 포함한다.

[0109] EZH2 매개 단백질 메틸화가 어떠한 역할을 담당하는 질환은 암, 세포 증식성 질환 또는 전암성 병태일 수 있다. 본 발명은, 본 발명의 조성물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물의, 암 치료를 필요로 하는 피험체에 대해 이와 같은 치료에 유용한 의약품의 제조를 위한 용도를 추가로 제공한다. 치료될 수 있는 예시적 암은 림프종, 예를 들어 비호지킨 림프종, 여포성 림프종(FL) 및 범발성 대형 B 세포 림프종(DLBCL), 예를 들어 GCB 림프종을 포함한다.

[0110] 일반적으로 메틸화 조정제인 화합물은 일반적으로 세포 증식을 조정하는데 사용될 수 있다. 예를 들어 몇몇 경우에 있어서, 과도한 증식은 메틸화를 감소시키는 제제로 감소될 수 있는 반면에, 불충분한 증식은 메틸화를 증가시키는 제제로 자극될 수 있다. 그러므로, 본 발명의 화합물에 의해 치료될 수 있는 질병들은 과증식성 질병, 예를 들어 양성 세포 성장과 악성 세포 성장을 포함한다.

[0111] 본원에 사용된 "~를 필요로 하는 피험체"는, EZH2-매개 단백질 메틸화가 어떠한 역할을 담당하는 질환이 발병한 피험체, 또는 이러한 질환이 발달할 위험이 모집단 전체의 경우에 비하여 증가한 피험체이다. "~를 필요로 하는 피험체"는 전암성 병태가 발병하였을 수 있다. 바람직하게 "~를 필요로 하는 피험체"는 암이 발병하였다. "피험체"는 포유동물을 포함한다. 포유동물은, 예를 들어 임의의 포유동물, 예를 들어, 인간, 영장류, 조류, 마우스, 래트, 개, 고양이, 소, 말, 염소, 낙타, 양 또는 돼지일 수 있다. 바람직하게 포유동물은 인간이다.

[0112] 본 발명의 피험체는 암 또는 전암성 병태로 이미 진단받았거나, 이러한 암 또는 전암성 병태의 증상들이 발생하거나 또는 이러한 암 또는 전암성 병태로의 발달 위험이 있는 임의의 인간 피험체를 포함한다. 본 발명의 피험체는 돌연변이체 EZH2를 발현하는 임의의 인간 피험체를 포함한다. 예를 들어 돌연변이체 EZH2는 1 개 이상의 돌연변이를 포함하는데, 여기서 이 돌연변이는 치환, 점 돌연변이, 넌센스 돌연변이, 미스센스 돌연변이, 결실, 삽입, 또는 기타 본원에 기술된 임의의 EZH2 돌연변이이다.

[0113] "~를 필요로 하는 피험체"는 난치성 또는 내성 암이 발병하였을 수 있다. "난치성 또는 내성 암"이란, 치료에 응답하지 않는 암을 의미한다. 암은 치료 개시시에 내성일 수 있거나, 또는 치료가 진행되는 동안에 내성이 될 수 있다. 몇몇 구현예들에서, "~를 필요로 하는 피험체"는 가장 최근의 요법에 대해 차도를 나타낸 후 암이 재발한 피험체이다. 몇몇 구현예들에서, "~를 필요로 하는 피험체"는 암 치료를 위한 것으로서 공지된 모든 효과적인 요법들을 처치받았거나 이와 같은 요법들에서 실패를 거둔 피험체이다. 몇몇 구현예들에서, "~를 필요로 하는 피험체"는 적어도 1 개의 사전 요법(prior therapy)을 처치받은 피험체이다. 특정 구현예들에서, 사전 요법은 단일 요법이다. 특정 구현예들에서, 사전 요법은 병용 요법이다.

[0114] 몇몇 구현예에서, "~를 필요로 하는 피험체"는 이전의 요법으로 말미암아 속발성 암이 발병할 수 있다. "속발성 암"이란, 이전의 발암성 요법, 예를 들어 화학요법으로 기인하거나 이의 결과로서 발생하는 암을 의미한다.

[0115] 피험체는 또한 EZH2 히스톤 메틸기전이효소 억제제 또는 기타 임의의 치료제에 내성을 보일 수도 있다.

[0116] 본 발명은 또한 암이 발병한 피험체를 대상으로 하는 병용 요법을 선택하는 방법을 특징으로 하기도 한다. 상기 방법은, 피험체로부터 유래한 시료 중에서 본원에 기술된 EZH2 돌연변이 1 개 이상을 검출하는 단계; 그리고 1 개 이상의 EZH2 돌연변이 존재를 기반으로 하여 암 치료를 위한 병용 요법을 선택하는 단계를 포함한다. 하나의 구현예에서, 요법은 피험체에 본 발명의 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 하나의 구현예에서, 상기 방법은 피험체에 본 발명의 조성물 치료학적 유효량을 투여하는 단계를 추가로 포함한다. EZH2 돌연변이는 당업계에 공지된 임의의 적당한 방법이 사용되어 검출될 수 있다. 더 많은 방법들이, 그 자체로서 본원에 참고문헌으로 인

용되어 있는, 미국 특허출원 공개 US 20130040906에 기술되어 있다.

[0117] 본원에 기술된 방법 및 사용 방법은, 본 발명의 조성물(예를 들어, 화합물 44 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염과, 1 개 이상의 치료제를 포함하는 조성물)의 피험체로의 투여 전 및/또는 투여 후에, 이러한 투여를 필요로 하는 피험체로부터 유래하는 시료에서 본원에 기술된 EZH2 돌연변이 1 개 이상을 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 테스트된 시료 중에 본원에 기술된 EZH2 돌연변이 1 개 이상이 존재함은, 해당 피험체가 본 발명의 병용 요법에 응답한다는 것을 말해주는 것이다.

[0118] 본 발명은 피험체에 있어서 본원에 기술된 EZH2 돌연변이 1 개 이상의 유전자 스크리닝에 의하여 피험체에 대한 개인 맞춤형 의약품, 치료 및/또는 암 관리를 제공한다. 예를 들어 본 발명은, 병용 요법에 대한 피험체의 응답성을 측정하고, 피험체가 병용 요법에 응답할 때, 피험체에 본 발명의 조성물을 투여함으로써, 암 또는 전암성 병태의 치료 또는 완화를 필요로 하는 피험체에서 상기와 같이 암 또는 전암성 병태를 치료 또는 완화하기 위한 방법을 제공한다. 응답성은, 피험체로부터 시료를 얻은 다음, 본원에 기술된 EZH2 돌연변이 1 개 이상을 검출하여 측정되는데, 이와 같이 본원에 기술된 EZH2 돌연변이 1 개 이상의 존재는, 해당 피험체가 본 발명의 조성물에 응답한다는 것을 말해준다. 일단 피험체의 응답성이 측정되면, 조성물, 예를 들어 화합물 44 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염과, 1 개 이상의 치료제를 포함하는 조성물 치료학적 유효량이 투여될 수 있다. 조성물의 치료학적 유효량은 당업자에 의해 결정될 수 있다.

[0119] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "응답성"은 용어들 "응답하는", "감수성인" 및 "감수성"과 호환되어 사용될 수 있으며, 이는, 본 발명의 조성물이 투여되었을 때 피험체가 보이는 치료 응답, 예를 들어 피험체의 종양 세포 또는 종양 조직이 세포자살 및/또는 세포괴사를 진행하고/진행하거나, 감소된 성장, 분열 또는 증식을 보이는 경우를 의미한다. 이 용어는 또한 본 발명의 조성물이 투여되었을 때 피험체가 치료 응답, 예를 들어 피험체의 종양 세포 또는 종양 조직이 세포자살 및/또는 세포괴사를 진행하고/진행하거나, 감소된 성장, 분열 또는 증식을 보일 것이거나, 모집단 전체에 비하여 이와 같은 치료 응답을 보일 확률이 높음을 의미하기도 한다.

[0120] "시료"란, 피험체로부터 유래하는 임의의 생물학적 시료를 의미하는데, 세포, 조직 시료, 체액(점액, 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 타액 및 정액을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아님), 종양 세포 및 종양 조직을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 바람직하게 시료는 골수, 말초 혈액 세포, 혈액, 혈장 및 혈청으로부터 선택된다. 시료는 치료중이거나 테스트중인 피험체에 의해 제공될 수 있다. 대안적으로 시료는 당업계의 통상의 실무에 따라서 전문의에 의해 얻어질 수 있다.

[0121] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "세포 증식성 질환"이란, 세포의 조절되지 않는 성장 또는 비정상적인 성장, 아니면 이것들 둘 다가 원치않는(암성일 수 있거나 아닐 수 있는) 병태 또는 질병의 발달을 유도할 수 있는 병태를 지칭한다. 본 발명의 예시적 세포 증식성 질환은, 세포 분열이 조절 해제된 다수의 병태를 포함한다. 예시적인 세포 증식성 질환은 신생물, 양성 종양, 악성 종양, 전암성 병태, 제자리 종양, 피포화된 종양, 전이성 종양, 액체 종양, 고형 종양, 면역학적 종양, 혈액학적 종양, 암, 암종, 백혈병, 림프종, 육종 및 급속 분열 세포(rapidly dividing cell)를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "급속 분열 세포"는, 동일한 조직 내에서 이웃하고 있거나 나란히 있는 세포들 가운데 예상 또는 실측되는 속도를 초과하거나 이보다 더 빠른 속도로 분열하는 임의의 세포로서 정의된다. 세포 증식성 질환은 전암 또는 전암성 병태를 포함한다. 세포 증식성 질환은 암을 포함한다. 바람직하게 본원에 제공된 방법들은 암의 증상을 치료 또는 완화하는데 사용된다. 용어 "암"은 고형암뿐만 아니라, 혈액학적 종양 및/또는 악성 종양을 포함한다. "전암 세포" 또는 "전암성 세포"는 전암 또는 전암성 병태인 세포 증식성 질환을 나타내는 세포이다. "암 세포" 또는 "암성 세포"는 암인 세포 증식성 질환을 나타내는 세포이다. 암 세포 또는 전암성 세포를 동정하기 위해 임의의 재현 가능한 측정 수단이 사용될 수 있다. 암 세포 또는 전암성 세포는 조직 시료(예를 들어, 생검 시료)의 조직학적 형별(histological typing) 또는 등급부여(grading)에 의해 동정될 수 있다. 암 세포 또는 전암성 세포는 적당한 문자 마커의 사용을 통해 동정될 수 있다.

[0122] 치료될 암은 DNA 세포분석, 유동 세포분석 또는 영상 세포분석에 의해 평가될 수 있다. 치료될 암은 세포들의 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%가 세포 분열 중 합성기(예를 들어, 세포 분열의 S기)에 있는 것으로 형별될 수 있다. 치료될 암은 저 S기 구간 또는 고 S기 구간에 있는 것으로서 형별될 수 있다.

[0123] 본원에 사용된 바와 같은 "정상 세포"는, "세포 증식성 질환"의 일부로서 분류될 수 없는 세포이다. 정상 세포는 원치않는 병태 또는 질병의 발달을 유도할 수 있는, 조절되지 않는 성장 또는 비정상적인 성장, 아니면 이것들 둘 다를 보이지 않는다. 바람직하게 정상 세포는 정상적으로 작용을 하는 세포주기 확인점 제어 기작을 가진다.

- [0124] 본원에 사용된 바와 같은 "세포를 접촉시키는 것"은, 중요 화합물 또는 기타 중요 조성물이 세포와 직접 접촉하거나, 세포 내에서 원하는 생물학적 효과를 유도하기에 충분히 가까이에 있는 상태를 지칭한다.
- [0125] 본원에 사용된 바와 같은 "후보 화합물"은, 해당 화합물이 연구자나 임상의에 의해 구하여진 세포, 조직, 계통, 동물 또는 인간에서 원하는 생물학적 또는 의학적 응답이 유도될 수 있을지 여부를 확인하기 위해서, 1 개 이상의 시험관 내 또는 생체 내 생물학적 분석법에서 테스트된 바 있거나 테스트될, 본 발명의 화합물, 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물을 지칭한다. 후보 화합물은 본 발명의 화합물, 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물이다. 생물학적 또는 의학적 응답은 암의 치료일 수 있다. 생물학적 또는 의학적 응답은 세포 증식성 질환의 치료 또는 예방일 수 있다. 시험관 내 또는 생체 내 생물학적 분석법은 효소 활성 분석법, 전기영동 이동도 변동 분석법, 리포터 유전자 분석법, 시험관 내 세포 자생력 분석법, 그리고 본원에 기술된 분석법들을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0126] 본원에 사용된 바와 같은 "치료하는 것" 또는 "치료하다"란, 질병, 병태 또는 질환을 이겨낼 목적으로 환자를 관리 및 보호하는 것을 말하며, 질병, 병태 또는 질환의 증상이나 합병증을 완화하기 위하거나, 또는 질병, 병태 또는 질환을 완치하기 위하여 본 발명의 화합물, 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물을 투여하는 것을 포함한다.
- [0127] 본 발명의 조성물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물은 또한 질병, 병태 또는 질환을 예방하기 위해 사용될 수도 있다. 본원에 사용된 바와 같은 "예방하는 것" 또는 "예방하다"란, 질병, 병태 또는 질환의 증상이나 합병증의 개시를 감소 또는 막는 것을 말한다.
- [0128] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "완화하다"란, 질환의 증상이나 징후의 심각성이 감소하는 과정을 의미한다. 중요한 점은, 징후나 증상은 완치되지 않고 완화될 수 있다는 점이다. 바람직한 구현예에서, 본 발명의 약학 조성물의 투여는 징후나 증상의 완치를 유도하지만, 이와 같은 완치는 반드시 필요한 것은 아니다. 유효 용량은 징후나 증상의 심각성을 감소시킬 것으로 예상된다. 예를 들어 다수의 병소에서 발생할 수 있는 질환, 예를 들어 암의 징후나 증상은, 만일 해당 암의 심각성이 다수의 병소들 중 적어도 한군데에서 감소된다면, 완화된 것이다.
- [0129] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "심각성"은, 암이 전암성 또는 양성 상태에서 악성 상태로 변형될 가능성을 설명해 주어야 할 것이다. 대안적으로 또는 부가적으로 심각성은, 예를 들어 (국제 암 연합(UICC) 및 미국 공동 암 위원회(AJCC)에 의해 승인된) T NM 시스템에 따르거나 또는 기타 업계에 인식된 방법들에 의해 암의 단계를 설명해 주어야 할 것이다. 암의 단계란, 요소들, 예를 들어 원발성 종양의 병소, 종양 크기, 종양의 수, 그리고 림프절 관련여부(암이 림프절로 확산되었는지 여부)를 기반으로 한 암의 정도 또는 심각성을 지칭한다. 대안적으로 또는 부가적으로, 심각성은 업계에 인식된 방법에 의해 종양의 등급을 설명해 주어야 할 것이다(국립 암 연구소, www.cancer.gov 참조). 종양의 등급은, 암 세포가 현미경 하에서 어떻게 비정상적으로 보이는지와, 종양이 어떻게 급속하게 성장하여 확산되는지의 관점에서, 암 세포들을 분류하는데 사용되는 체계이다. 종양 등급이 결정될 때에는 다수의 요소들, 예를 들어 세포의 구조와 성장 패턴이 고려된다. 종양 등급을 결정하는데 사용되는 특이적 요소들은 암의 유형 각각에 따라서 달라진다. 심각성은 또한, 얼마나 많은 종양 세포들이 동일 유형의 조직을 이루는 정상 세포들과 닮았는지를 말해주는 조직학적 등급("분화"라고도 칭하여짐)도 설명해준다(국립 암 연구소, www.cancer.gov 참조). 더이 심각성은, 종양 세포내 핵의 크기와 형태, 그리고 분열중인 종양 세포의 백분율을 말해주는 핵 분화도를 설명해준다(국립 암 연구소, www.cancer.gov 참조).
- [0130] 본 발명의 다른 양태에서, 심각성은, 종양이 성장 인자들을 분비한 정도나, 세포 외 매트릭스를 분해한 정도나, 맥관화된 정도나, 나란히 있는 조직에 대한 부착성이 상실된 정도, 또는 전이된 정도를 설명해준다. 더이, 심각성은 원발성 종양이 전이된 병소의 수를 설명해준다. 마지막으로, 심각성은 다양한 유형의 종양들과 이 종양들이 발생한 병소를 치료함에 있어서의 난점을 포함한다. 예를 들어 수술이 불가능한 종양, 다수의 신체 계통에 대한 접근성이 더 큰 암(혈액학적 및 면역학적 종양)과, 전통적인 치료에 가장 큰 내성을 보이는 암이 가장 심각한 암으로 간주된다. 이와 같은 상황에서, 피험체의 기대 수명을 늘리는 것 및/또는 통증을 줄이는 것, 암 세포의 비율을 낮추는 것 또는 세포들을 하나의 계통에 제한시키는 것, 그리고 암의 단계/종양 등급/조직학적 등급/핵 분화도를 개선하는 것은 암의 징후나 증상을 완화하는 것으로 간주된다.
- [0131] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "증상"은, 질병, 병증, 손상 또는 체내에서 일어나는 것이 바람직하지 않은 그 어떤 현상에 대한 표시로서 정의된다. 증상은, 해당 증상을 경험하고 있는 개체에 의하여 느껴지거나 지각되지, "타인"에 의해서는 쉽게 지각될 수 없다. 이때의 "타인"은 건강 관리 전문가가 아닌 사람으로서 정의된다.

- [0132] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "징후"는 또한, 체내에서 일어나는 것이 바람직하지 않은 그 어떤 현상에 대한 표시로서 정의되기도 한다. 그러나 징후는 의사, 간호사 또는 기타 건강 관리 전문가에 의해 관찰될 수 있는 그 어떤 현상으로서 정의된다.
- [0133] 암은 거의 모든 임의의 정후 또는 증상을 일으킬 수 있는 질병의 군이다. 징후 및 증상은, 암이 어느 부위에 발병하였는지와, 암의 크기, 그리고 암이 근처의 장기 또는 구조에 얼마나 많은 영향을 미치는지에 의존할 것이다. 만일 암이 확산되면(전이되면), 증상은 체내 상이한 부분들에서 나타날 수 있다.
- [0134] 암 치료는 종양 크기의 감소를 초래할 수 있다. 종양 크기의 감소는 또한 "종양 퇴행"으로 지칭될 수도 있다. 바람직하게 치료후 종양 크기는, 치료전 종양 크기에 비하여 5% 이상까지 감소되고; 더 바람직하게 종양 크기는 10% 이상까지 감소되며; 더 바람직하게 20% 이상까지 감소되고; 더 바람직하게 30% 이상까지 감소되며; 더 바람직하게 40% 이상까지 감소되고; 훨씬 더 바람직하게 50% 이상까지 감소되며; 가장 바람직하게 75% 이상까지 감소된다. 종양의 크기는 임의의 재현 가능한 측정 수단에 의해 측정될 수 있다. 종양 크기는 종양의 지름으로서 측정될 수 있다.
- [0135] 암 치료는 종양 부피의 감소를 초래할 수 있다. 바람직하게 치료후 종양 부피는, 치료전 종양 크기에 비하여 5% 이상까지 감소되고; 더 바람직하게 종양 부피는 10% 이상까지 감소되며; 더 바람직하게 20% 이상까지 감소되고; 더 바람직하게 30% 이상까지 감소되며; 더 바람직하게 40% 이상까지 감소되고; 훨씬 더 바람직하게 50% 이상까지 감소되며; 가장 바람직하게 75% 이상까지 감소된다. 종양의 부피는 임의의 재현 가능한 측정 수단에 의해 측정될 수 있다. 종양 부피는 종양의 재현 가능한 측정 수단에 의해 측정될 수 있다.
- [0136] 암 치료는 종양 수의 감소를 초래한다. 바람직하게 치료후 종양 수는, 치료전 종양 수에 비하여 5% 이상까지 감소되고; 더 바람직하게 종양 수는 10% 이상까지 감소되며; 더 바람직하게 20% 이상까지 감소되고; 더 바람직하게 30% 이상까지 감소되며; 더 바람직하게 40% 이상까지 감소되고; 훨씬 더 바람직하게 50% 이상까지 감소되며; 가장 바람직하게 75% 이상까지 감소된다. 종양 수는 임의의 재현 가능한 측정 수단에 의해 측정될 수 있다. 종양 수는 나안으로 확인될 수 있거나 특정 배율로 확대되었을 때 확인될 수 있는 종양을 계수하여 측정될 수 있다. 바람직하게 특정 배율은 2×, 3×, 4×, 5×, 10× 또는 50×이다.
- [0137] 암 치료는 원발성 종양 위치와 멀리 떨어져 있는 다른 조직이나 장기에서의 전이 병소 수 감소를 초래할 수 있다. 바람직하게, 치료후 전이 병소 수는 치료전 전이 병소 수에 비하여 5% 이상까지 감소되고; 더 바람직하게 전이 병소 수는 10% 이상까지 감소되며; 더 바람직하게 20% 이상까지 감소되고; 더 바람직하게 30% 이상까지 감소되며; 더 바람직하게 40% 이상까지 감소되고; 훨씬 더 바람직하게 50% 이상까지 감소되며; 가장 바람직하게 75% 이상까지 감소된다. 전이 병소 수는 임의의 재현 가능한 측정 수단에 의해 측정될 수 있다. 전이 병소 수는 나안으로 확인될 수 있거나 특정 배율로 확대되었을 때 확인될 수 있는 전이 병소 수를 계수하여 측정될 수 있다. 바람직하게 특정 배율은 2×, 3×, 4×, 5×, 10× 또는 50×이다.
- [0138] 암 치료는 운반체만을 투여받은 모집단의 평균 생존 시간과 비교되었을 때, 치료된 피험체 모집단의 평균 생존 시간의 증가를 초래할 수 있다. 바람직하게 평균 생존 시간은 30 일 초과까지 증가되고; 더 바람직하게는 60 일 초과; 더 바람직하게는 90 일 초과; 그리고 가장 바람직하게는 120 일 초과까지 증가된다. 모집단의 평균 생존 시간 증가는 임의의 재현 가능한 측정 수단에 의해 측정될 수 있다. 모집단의 평균 생존 시간 증가는, 예를 들어 활성 화합물이 사용되는 치료 개시후 모집단 생존 기간의 평균 길이를 산정함으로써 측정될 수 있다. 모집단의 평균 생존 시간의 증가는 또한, 예를 들어 활성 화합물이 사용되는 치료의 제1 라운드 종료후 모집단 생존 시간의 평균 길이를 산정함으로써 측정될 수 있다.
- [0139] 암 치료는 비치료 피험체들 모집단의 평균 생존 시간과 비교되었을 때, 치료된 피험체들 모집단의 평균 생존 시간 증가를 초래할 수 있다. 바람직하게 평균 생존 시간은 30 일 초과까지 증가되고; 더 바람직하게는 60 일 초과; 더 바람직하게는 90 일 초과; 그리고 가장 바람직하게는 120 일 초과까지 증가된다. 모집단의 평균 생존 시간 증가는 임의의 재현 가능한 수단에 의해 측정될 수 있다. 모집단의 평균 생존 시간의 증가는, 예를 들어 활성 화합물이 사용되는 치료 개시후 모집단의 생존 시간의 평균 길이를 산정함으로써 측정될 수 있다. 모집단의 평균 생존 시간 증가는 또한, 예를 들어 활성 화합물이 사용되는 치료의 제1 라운드 종료후 모집단의 생존 시간의 평균 길이를 산정함으로써 측정될 수 있다.
- [0140] 암 치료는 본 발명의 화합물, 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물이 아닌 약물로 단일요법을 처치받은 모집단의 평균 생존 시간과 비교되었을 때, 치료된 피험체 모집단의 평균 생존 시간의 증가를 초래할 수 있다. 바람직하게 평균 생존 시간은 30 일 초과; 더 바람직하게 60 일 초과; 더 바람직하게 90 일 초과; 그리고

가장 바람직하게 120 일 초과까지 증가된다. 모집단의 평균 생존 시간 증가는 임의의 재현 가능한 수단에 의해 측정될 수 있다. 모집단의 평균 생존 시간의 증가는, 예를 들어 활성 화합물이 사용되는 치료 개시후 모집단 생존 시간의 평균 길이를 산정함으로써 측정될 수 있다. 모집단의 평균 생존 시간 증가는 또한, 예를 들어 활성 화합물이 사용되는 치료의 제1 라운드 종료후 모집단 생존 시간의 평균 길이를 산정함으로써 측정될 수 있다.

[0141] 암 치료는 운반체만을 처치받은 모집단의 사망률과 비교되었을 때, 치료된 피험체 모집단의 사망률의 감소를 초래할 수 있다. 암 치료는 비치료 모집단의 사망률과 비교되었을 때, 치료된 피험체 모집단의 사망률의 감소를 초래할 수 있다. 암 치료는 본 발명의 화합물, 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물이 아닌 약물로 단일요법을 처치받은 모집단의 사망률과 비교되었을 때, 치료된 피험체 모집단의 사망률의 감소를 초래할 수 있다. 바람직하게 사망률은 2% 초과; 더 바람직하게 5% 초과; 더 바람직하게 10% 초과; 그리고 가장 바람직하게 25% 초과까지 감소된다. 치료된 피험체 모집단의 사망률 감소는 임의의 재현 가능한 수단에 의해 측정될 수 있다. 모집단의 사망률 감소는, 예를 들어 활성 화합물이 사용되는 치료 개시후 모집단의 단위 시간당 질병 관련 사망자의 평균 수를 산정함으로써 측정될 수 있다. 모집단의 사망률 감소는 또한, 예를 들어 활성 화합물이 사용되는 치료의 제1 라운드 종료후 모집단의 단위 시간당 질병 관련 사망자의 평균 수를 산정함으로써 측정될 수도 있다.

[0142] 암 치료는 종양 성장 속도의 감소를 초래할 수 있다. 바람직하게 치료후 종양 성장 속도는 치료전 수에 비하여 적어도 5%까지 감소되고; 더 바람직하게 종양 성장 속도는 적어도 10%까지 감소되며; 더 바람직하게 적어도 20%까지 감소되고; 더 바람직하게 적어도 30%까지 감소되며; 더 바람직하게 적어도 40%까지 감소되고; 더 바람직하게 적어도 50%까지 감소되며; 훨씬 더 바람직하게 적어도 50%까지 감소되고; 가장 바람직하게 적어도 75%까지 감소된다. 종양 성장 속도는 임의의 재현 가능한 측정 수단에 의해 측정될 수 있다. 종양 성장 속도는 단위 시간당 종양 지름의 변화에 의해 측정될 수 있다.

[0143] 암 치료는 종양 재성장을 감소를 초래할 수 있다. 바람직하게 치료후 종양 재성장을은 5% 미만이고; 더 바람직하게 종양 재성장을은 10% 미만이며; 더 바람직하게 20% 미만이고; 더 바람직하게 30% 미만이며; 더 바람직하게 40% 미만이고; 더 바람직하게 50% 미만이며; 훨씬 더 바람직하게 50% 미만이고; 가장 바람직하게 75% 미만이다. 종양 재성장을은 임의의 재현 가능한 측정 수단에 의해 측정될 수 있다. 종양의 재성장을은, 예를 들어 이전에 치료되었을 때 수축되었던 종양의 종양 지름 증가를 측정함으로써 측정된다. 종양 재성장을 감소는, 치료 중단 후 종양이 재발되지 않는 것에 의해 나타내어진다.

[0144] 세포 증식성 질환의 치료 또는 예방은 세포 증식 속도의 감소를 초래할 수 있다. 바람직하게 치료후 세포 증식 속도는 적어도 5%; 더 바람직하게 적어도 10%; 더 바람직하게 적어도 20%; 더 바람직하게 적어도 30%; 더 바람직하게 적어도 40%; 더 바람직하게 적어도 50%; 훨씬 더 바람직하게 적어도 50%; 그리고 가장 바람직하게 적어도 75%까지 감소된다. 세포 증식 속도는 임의의 재현 가능한 측정 수단에 의해 측정될 수 있다. 세포 증식 속도는, 예를 들어 단위 시간당 조직 시료중 분열하는 세포의 수를 측정함으로써 측정된다.

[0145] 세포 증식성 질환의 치료 또는 예방은 증식중인 세포의 비율 감소를 초래할 수 있다. 바람직하게 치료후 증식중인 세포의 비율은 적어도 5%; 더 바람직하게 적어도 10%; 더 바람직하게 적어도 20%; 더 바람직하게 적어도 30%; 더 바람직하게 적어도 40%; 더 바람직하게 적어도 50%; 훨씬 더 바람직하게 적어도 50%; 그리고 가장 바람직하게 적어도 75%까지 감소된다. 증식중인 세포의 비율은 임의의 재현 가능한 측정 수단에 의해 측정될 수 있다. 바람직하게 증식중인 세포의 비율은, 예를 들어 조직 시료중 분열하지 않는 세포의 수에 비하여 분열 중인 세포의 수를 정량함으로써 측정된다. 증식중인 세포의 비율은 분열 지수와 동일할 수 있다.

[0146] 세포 증식성 질환의 치료 또는 예방은 세포 증식 영역 또는 대역의 크기 감소를 초래할 수 있다. 바람직하게 치료후 세포 증식 영역 또는 대역의 크기는 치료전 세포 증식 영역 또는 대역의 크기에 비하여 적어도 5%까지 감소되고; 더 바람직하게 적어도 10%까지 감소되며; 더 바람직하게 적어도 20%까지 감소되고; 더 바람직하게 적어도 30%까지 감소되며; 더 바람직하게 적어도 40%까지 감소되고; 더 바람직하게 적어도 50%까지 감소되며; 훨씬 더 바람직하게 적어도 50%까지 감소되고; 그리고 가장 바람직하게 적어도 75%까지 감소된다. 세포 증식 영역 또는 대역의 크기는 임의의 재현 가능한 측정 수단에 의해 측정될 수 있다. 세포 증식 영역 또는 대역의 크기는 세포 증식 영역 또는 대역의 지름 또는 폭으로서 측정될 수 있다.

[0147] 세포 증식성 질환의 치료 또는 예방은 비정상적인 외관 또는 형태를 가지는 세포의 수 또는 비율 감소를 초래할 수 있다. 바람직하게 치료후 비정상적인 형태를 가지는 세포의 수는 치료전 비정상적인 형태를 가지는 세포의 수에 비하여 적어도 5%까지 감소되고; 더 바람직하게 적어도 10%까지 감소되며; 더 바람직하게 적어도 20%까지 감소되고; 더 바람직하게 적어도 30%까지 감소되며; 더 바람직하게 적어도 40%까지 감소되고; 더 바람직하게 적

어도 50%까지 감소되며; 훨씬 더 바람직하게 적어도 50%까지 감소되고; 그리고 가장 바람직하게 적어도 75%까지 감소된다. 비정상적인 세포 외관 또는 형태는 임의의 재현 가능한 측정 수단에 의해 측정될 수 있다. 비정상적인 세포 외관 또는 형태는, 예를 들어 반전된 조직 배양 현미경이 사용되는 현미경 관찰에 의해 측정될 수 있다. 비정상적인 세포 형태는 핵 다형태성의 형태를 취할 수 있다.

[0148]

본원에 사용된 바와 같은 용어 "선택적으로"는, 어떤 현상이 다른 모집단에서보다 어느 하나의 모집단에서 높은 발생 빈도로 발생하는 경향을 의미한다. 비교 대상인 모집단은 세포 모집단일 수 있다. 바람직하게 본 발명의 화합물, 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물은 암 또는 전암성 세포에 선택적으로 작용을 하지만, 정상 세포에서는 그러하지 않다. 바람직하게 본 발명의 화합물, 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물은 하나의 분자 표적(예를 들어, 표적 단백질 메틸기전이효소)을 조정하도록 선택적으로 작용을 하지만, 다른 분자 표적(예를 들어, 비 표적 단백질 메틸기전이효소)을 유의적으로 조정하지는 않는다. 본 발명은 또한 효소, 예를 들어 단백질 메틸기전이효소의 활성을 선택적으로 억제하는 방법을 제공하기도 한다. 바람직하게 하나의 현상은, 만일 그 현상이 모집단 B와 비교되었을 때 모집단 A에서 2 배 더 빈번하게 발생한다면, 모집단 B에 비하여 모집단 A내에서 선택적으로 발생하는 것이 된다. 만일 하나의 현상이 모집단 A에서 5 배 이상 더 빈번하게 발생한다면, 그 현상은 선택적으로 발생하는 것이 된다. 만일 하나의 현상이 모집단 B와 비교되었을 때 모집단 A에서 10 배 이상; 바람직하게 50 배 이상; 훨씬 더 바람직하게 100 배 이상; 그리고 가장 바람직하게 1000 배 이상 더 빈번하게 발생한다면, 그 현상은 선택적으로 발생하는 것이 된다. 예를 들어 세포 사멸은, 이 세포 사멸이 정상 세포에 비교되었을 때, 암 세포에서 2 배 이상 빈번하게 발생한다면, 암 세포에서 선택적으로 발생한다고 일컬어질 것이다.

[0149]

본 발명의 조성물, 예를 들어 화합물 44 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염과, 1 개 이상의 기타 치료제, 예를 들어 프레드니손은 분자 표적(예를 들어, 표적 단백질 메틸기전이효소)의 활성을 조정할 수 있다. 조정이란, 분자 표적의 활성을 촉진하거나 억제하는 것을 지칭한다. 바람직하게 본 발명의 화합물, 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물은, 만일 그것이 분자 표적의 활성을, 동일한 조건이되, 단지 상기 화합물이 존재하지 않는 조건하에 있는 분자 표적의 활성에 비하여 적어도 2 배까지 자극하거나 억제하면, 분자 표적의 활성을 조정하는 것이 된다. 더 바람직하게 본 발명의 화합물, 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물은, 만일 그것이 분자 표적의 활성을, 동일한 조건이되, 단지 상기 화합물이 존재하지 않는 조건하에 있는 분자 표적의 활성에 비하여 적어도 5배, 적어도 10 배, 적어도 20 배, 적어도 50 배, 적어도 100 배까지 자극하거나 억제하면, 분자 표적의 활성을 조정하는 것이 된다. 분자 표적의 활성은 임의의 재현 가능한 수단에 의해 측정될 수 있다. 분자 표적의 활성은 시험관 내 또는 생체 내 측정될 수 있다. 예를 들어 분자 표적의 활성은 효소 활성 분석법 또는 DNA 결합 분석법에 의해 시험관 내에서 측정될 수 있거나, 또는 분자 표적의 활성은 리포터 유전자의 발현을 분석함으로써 생체 내 측정될 수 있다.

[0150]

본 발명의 조성물은, 만일 화합물의 첨가가 분자 표적의 활성을, 동일한 조건이되, 단지 상기 화합물이 존재하지 않는 조건하에 있는 분자 표적의 활성에 비하여 10% 이상까지 자극 또는 억제하지 않는다면, 분자 표적의 활성을 유의적으로 조정하지 않는 것이 된다.

[0151]

본원에 사용된 바와 같은 용어 "동질 효소 선택적인"이란, 어느 효소의 제2 동질 효소와 비교되었을 때 해당 효소의 제1 동질 효소를 선호하여 억제 또는 자극하는 경우(예를 들어, 단백질 메틸기전이효소 동질 효소 베타와 비교되었을 때 단백질 메틸기전이효소 동질 효소 알파를 선호하여 억제 또는 자극하는 경우)를 의미한다. 바람직하게 본 발명의 화합물, 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물은 생물학적 효과를 달성하는데 필요한 용량에 있어서 적어도 4 배, 바람직하게는 10 배, 더 바람직하게는 50 배 차이를 나타낸다. 바람직하게 본 발명의 화합물, 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물은 억제 범위에 걸쳐 이와 같은 차이를 나타내고, 그 차이는 관심있는 분자 표적에 대해 IC_{50} (즉 50% 억제)에서 예시된다.

[0152]

본 발명의 조성물의 투여를 필요로 하는 세포 또는 피험체에 이러한 조성물을 투여하는 것은, 관심있는 단백질 메틸기전이효소 활성의 조정(즉 자극 또는 억제)을 초래할 수 있다.

[0153]

본 발명의 화합물, 예를 들어 화합물 44 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염과, 1 개 이상의 기타 치료제, 예를 들어 프레드니손을 포함하는 조성물을 이의 투여를 필요로 하는 세포나 피험체에 투여하는 것은, 세포 내 표적(예를 들어, 기질)의 활성 조정(즉 자극 또는 억제)을 초래한다. 몇몇 세포 내 표적들은 본 발명의 화합물, 예를 들어 단백질 메틸기전이효소(이에 한정되는 것은 아님)로 조정될 수 있다.

[0154]

활성화란, 물질(예를 들어, 단백질 또는 핵산)의 조성물이 원하는 생물학적 기능을 수행하기에 적당한 상태로 만들어지는 것을 지칭한다. 활성화될 수 있는 물질의 조성물은 또한 불활성화된 상태를 가지기도 한다. 물질의

활성화된 조성물은 억제 생물 기능 또는 자극 생물 기능, 아니면 이 둘 다를 가질 수 있다. 상승이란, 물질(예를 들어, 단백질 또는 핵산)의 조성물의 원하는 생물학적 활성의 증가를 지칭한다. 상승은 물질의 조성물 농도 증가를 통해 일어날 수 있다.

[0155] 본원에 사용된 바와 같은 "세포주기 확인점 경로"란, 세포주기 확인점 조정에 관여하는 생화학적 경로를 지칭한다. 세포주기 확인점 경로는 세포주기 확인점을 포함하는 1 개 이상의 기능에 대해 자극 효과 또는 억제 효과, 아니면 이 둘 다를 발휘할 수 있다. 세포주기 확인점 경로는 물질, 바람직하게는 단백질의 조성물 적어도 2 개로 이루어져 있는데, 이 조성물 둘 다는 세포주기 확인점의 조정에 기여한다. 세포주기 확인점 경로는 이 세포주기 확인점 경로에 관여하는 일원 1 개 이상을 활성화함으로써 활성화될 수 있다. 바람직하게 세포주기 확인점 경로는 생화학적 신호 전달 경로이다.

[0156] 본원에 사용된 바와 같은 "세포주기 확인점 조절제"란, 세포주기 확인점 조정에 있어서 적어도 부분적으로나마 작용을 할 수 있는 물질의 조성물을 지칭한다. 세포주기 확인점 조절제는 세포주기 확인점을 포함하는 1 개 이상의 기능에 대해 자극 효과 또는 억제 효과, 아니면 이 둘 다를 발휘할 수 있다. 세포주기 확인점 조절제는 단백질일 수 있거나 단백질이 아닐 수 있다.

[0157] 암 또는 세포 증식성 질환의 치료는 세포 사멸을 초래할 수 있고, 바람직하게 세포 사멸은 모집단 내 세포 수의 적어도 10% 감소를 초래한다. 더 바람직하게 세포 사멸이란, 세포 수의 적어도 20%의 감소; 더 바람직하게 적어도 30%의 감소; 더 바람직하게 적어도 40%의 감소; 더 바람직하게 적어도 50%의 감소; 가장 바람직하게 적어도 75%의 감소를 의미한다. 모집단 내 세포 수는 임의의 재현 가능한 수단에 의해 측정될 수 있다. 모집단 내 세포 수는 형광도 활성화 세포 분류법(Fluorescence Activated Cell Sorting; FACS), 면역 형광도 현미경(immunofluorescence microscopy) 및 광학 현미경에 의해 측정될 수 있다. 세포 사멸 측정 방법은 문헌[Li *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100(5): 2674-8, 2003]에 나타내어져 있다. 하나의 양태에서, 세포 사멸은 세포자살에 의해 발생한다.

[0158] 바람직하게 본 발명의 조성물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물의 유효량은 정상 세포에 대해 유의적으로 세포 독성을 나타내지는 않는다. 화합물의 치료학적 유효량은, 만일 화합물 치료학적 유효량만큼의 투여가 정상 세포의 10% 이상에서 세포 사멸을 유도하지 않는다면, 정상 세포에 대해 유의적으로 세포 독성을 나타내지 않는 것이다. 화합물의 치료학적 유효량은, 만일 화합물 치료학적 유효량만큼의 투여가 정상 세포의 10% 이상에서 세포 사멸을 유도하지 않는다면, 정상 세포의 자생력에 유의적으로 영향을 미치지 않는 것이다. 하나의 양태에서, 세포 사멸은 세포자살에 의해 일어난다.

[0159] 본 발명의 조성물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물과 세포의 접촉은 암 세포 내에서 세포 사멸을 선택적으로 유도 또는 활성화할 수 있다. 본 발명의 화합물, 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물의 투여를 필요로 하는 피험체에 이러한 화합물, 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물을 투여하는 것은, 암 세포 내에서 세포 사멸을 선택적으로 유도 또는 활성화할 수 있다. 본 발명의 조성물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물과 세포의 접촉은 세포 증식성 질환에 의해 영향을 받은 세포 1 개 이상에서 세포 사멸을 선택적으로 유도할 수 있다. 바람직하게 본 발명의 조성물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물의 투여를 필요로 하는 피험체에 이러한 조성물, 화합물, 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물을 투여하는 것은, 세포 증식성 질환에 의해 영향을 받은 세포 1 개 이상에서 세포 사멸을 선택적으로 유도한다.

[0160] 본 발명은, 본 발명의 조성물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물을 암 치료 또는 예방을 필요로 하는 피험체에 투여함으로써 암을 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것인데, 여기서, 본 발명의 조성물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물의 투여는, 다음과 같은 것들 중 1 개 이상을 초래한다: 세포주기의 1 개 이상의 기(예를 들어, G1, G1/S, G2/M)에 있는 세포의 축적, 또는 세포 노화의 유도, 또는 종양 세포 분화의 촉진을 통한 암 세포 증식의 예방; 동물에서의 세포 독성, 세포 괴사 또는 세포 자살(정상 세포는 유의적인 양만큼의 세포 사멸이 초래되지 않음), 항종양 활성(치료 지수 2 이상)을 통한 암 세포에서의 세포 사멸 촉진. 본원에 사용된 바와 같은 "치료 지수"는 최대 허용 용량이 유효 용량에 의해 나누어졌을 때의 값이다.

[0161] 당업자는 본원에 논의된 공지의 기술들 또는 이와 균등한 기술들에 관한 상세한 설명이 기술되어 있는 일반 참고 서적을 참조할 수 있다. 이러한 서적은 문헌[Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc. (2005); Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (3rd edition), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (2000)]; [Coligan *et al.*, *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, N.Y.]; [Enna *et al.*, *Current Protocols in Pharmacology*,

John Wiley & Sons, N.Y.]; [Fingl *et al.*, *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (1975)], [Remington's *Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, PA, 18th edition (1990)]을 포함한다. 이와 같은 문헌은 물론 본 발명의 하나의 양태를 이루거나 이용함에 있어서 참고될 수 있다.

[0162] **실시예 1.**

[0163] **글루코코르티코이드 및 EZH2 억제제의 상승적 항종양 활성**

화합물 44을, 본원에 전체가 참고로 포함되어 있는 미국 특허 번호 8,410,088에 기술되어 있는 바와 같이 합성하였다.

화합물 44(Cpd44)가 단지 글루코코르티코이드 수용체 작동제(GRag)인, CHOP의 프레드니솔론, 또는 기타 GRag, 예를 들어 텍사메타손과만 조합되었을 때, 극적인 상승효과가 관찰되었다. 화합물 44가 CHOP와 조합되었을 때, 이 화합물 44의 항증식 효과는 매우 증가하였으며, 이러한 상승효과 대부분은 CHOP의 GRag 성분인 프레드니솔론(프레드니손의 활성 대사산물)에 기인할 수 있다. 눈에 띄는 점은, 화합물 44와 프레드니솔론의 조합이, EZH2 억제에 감수성인 세포 범위를 돌연변이체 보유 GCB NHL 세포로부터 모든 GCB NHL 세포에 이르기까지 늘린다는 점이다.

[0166] 2 개의 EZH2 돌연변이체 세포주, 즉 WSU-DLCL2와 SU-DHL10을 화합물 44로 4 일 동안 예비 처리한 다음, 3 일 더 화합물 44와 개별 CHOP 성분들의 조합으로 공동 처리하였다(4+3 모델). 마포스파미드(사이클로포스파미드의 유사체), 독소루비신 및 빙크리스틴은 모두 돌연변이체 세포주에서 이것들 자체에 의한 농도 의존적 성장 억제를 나타내었다. 그러므로 화합물 44와 조합되는 상기 약물들에 대해 복합 지수(Combination Index; CI, CalcuSyn 소프트웨어가 사용되어 산정)를 구하였다. 그러나, 이러한 세포주들은 프레드니솔론(프레드니손의 활성 대사산물) 자체에 대한 감수성을 나타내지 않았다. 그러므로 이러한 경우 CI를 측정할 수 없었으며, 그 대신 프레드니 솔론의 농도-응답 곡선으로 나타내어지는 화합물 44의 IC₅₀ 변동을 기반으로 하여 효능 증가를 산정하였다.

[0167] 화합물 44와 마포스파미드의 조합은 EZH2 돌연변이체 세포주 둘 다에서 전체적인 부가 복합 이익을 가져왔다(도 1의 C 및 F). WSU-DLCL2 세포에 있어서, 화합물 44와 독소루비신의 조합은 4+3 모델에서 상승 작용하였던 반면에(도 1의 A), 이 조합은 SU-DHL10 세포에서는 부가적이었다(도 1의 D). 화합물 44와 빙크리스틴의 조합 또한 EZH2 돌연변이체 세포주 둘 다에서 부가작용(additivity)을 나타내었다(도 1의 B 및 E). WSU-DLCL2 세포를 프레드니솔론 및 화합물 44의 조합으로 처리하였을 때, 화합물 44의 큰 효능(greater potency)에 대해 9 배의 변동이 관찰되었다. 상이한 GRag, 텍사메타손 처리는 화합물 44의 IC₅₀에 있어서 17 배 더 큰 변동을 초래하였다(도 2a 및 도 2b). SU-DHL10 세포들에서도 화합물 44의 효능 변동(potency shift)에 유사한 경향이 관찰되었다(도 2c 및 도 2d).

[0168] 화합물 44와 CHOP의 복합 효과(combination effect)가 WT EZH2 림프종 세포주를 화합물 44에 감수성으로 만들 수 있었는지 여부를 관찰하였다. 화합물 44 처리 단독으로는 EZH2 WT 림프종 주에서 성장 억제를 유도하지 않으므로, 효능 변동을 개별 CHOP 성분들의 농도-응답 곡선을 기반으로 산정하였다. 4 개의 CHOP 성분들 중 오로지 GRag 및 화합물 44의 조합만이 WT GCB 림프종 세포주에서 효능 변동을 초래하였다.

[0169] 그 다음, 화합물 44와 CHOP의 복합 효과가 EZH2 돌연변이체 및 야생형 세포주, 즉 WSU-DLCL2 EZH2 돌연변이체(도 3a, 도 3b) 및 DOHH2 EZH2 야생형(도 3c, 도 3d) GCB 림프종 세포주를, 화합물 44에 감수성으로 만들 수 있었는지 여부를 관찰하였다. 프레드니솔론 및 화합물 44의 조합으로 WSU-DLCL2 세포를 처리하면, 화합물 44의 활성 증가가 유발되었는데(도 3a), 이때 화합물 44의 IC₅₀은 최대 24 배 감소하였다. 상이한 GRag, 즉 텍사메타손 처리는 화합물 44 IC₅₀의 30 배 이상의 감소를 초래하였다(도 3b). 프레드니솔론에 대한 생물학적 관련 농도 1 μM과, 텍사메타손에 대한 생물학적 관련 농도 100 nM에서, 효능 증가는 각각 7 배 및 15 배였다. 화합물 44는 DOHH2 EZH2 야생형 세포에서 단일 제제로서는 항증식 효과를 나타내지 않았으므로(도 3c, 도 3d), 프레드니 솔론 또는 텍사메타손의 효능 변동이 측정되었다. 흥미롭게도, 화합물 44를 야생형 GCB 림프종 세포주(DOHH2)에서 테스트하였을 때에는 CHOP의 오로지 GRag 성분만이 화합물 44 존재 하에서 증가된 효능을 나타내었다(도 3c, 도 3d). DOHH2 세포 내에서 프레드니솔론 또는 텍사메타손의 효능은 화합물 44가 첨가될 때 증가하였다(도 3c, 도 3d).

[0170] 오로지 GRag와 EZH2i 조합만이, 이 제제들 중 어느 하나만에 비교되었을 때, EZH2 WT 및 돌연변이체 GCB 림프종 세포주에서 극적으로 증가한 항증식 효과를 유도하였던 것을 고려하여, 화합물들의 처리 지속 기간 및/또는 첨가 순서가 감수성에 영향을 미쳤는지 여부를 확인하였다. 세포주 패널은 또한 EZH2 WT, EZH2 돌연변이체, 화합

물 44 감수성 및 EZH2 돌연변이체, 화합물 44 비감수성 세포주(이전에 McCabe외 다수에 의해 보고되었으나, 내부 데이터로서는 발표되지 않음)를 포함하도록 확대하였다. 이전의 4+3 모델에서 효능 변동은 (EZH2 Y646(Y641에서도 공지됨) 감수성 세포주에서의) 화합물 44 노출 또는 (EZH2 WT 세포주에서의) 프레드니솔론 노출 중 어느 하나를 기반으로 하였다. 이와 같은 실험 세트에 있어서 프레드니솔론의 고정된 농도에서의 화합물 44의 IC₅₀ 변동은, 4+3 모델, 4 일간 또는 7 일간 공동 처리, 또는 4 일간 프레드니솔론 전처리 + 3일간 공동 처리 중 어느 하나의 방식으로 처리된 세포주에서 복합 이익을 확인하는데 사용하였다. EZH2 돌연변이체, 즉 화합물 44 감수성 세포주를 4 일 동안 공동 처리하였을 때, 화합물 44의 IC₅₀은 30 배 내지 60 배 더 낮아졌음이 관찰되었는데, 이때 4+3 처리 스케줄에서의 IC₅₀도 유사한 경향을 나타내었다(표 1). 7 일간 공동 처리 및 4+3 모델에서도 유사한 결과들이 관찰되었다(표 1). EZH2 WT GCB 세포주에서, 4 일 경과시 측정 가능한 화합물 44의 IC₅₀이 얻어지지 않았음에도 불구하고 상기 두 세포주는 프레드니솔론 공동 처리 4 일 경과시 감소된 증식 및 측정 가능한 화합물 44 IC₅₀을 나타내었다(표 1). EZH2 WT GCB 세포주는 또한 4+3 모델 및/또는 7 일간 공동 처리 스케줄에 응답하였다(표 1). 놀랍게도, 4 일간 처리후 측정 가능한 화합물 44 IC₅₀을 나타내지 않는 EZH2 돌연변이체, 즉 화합물 44 비감수성 세포주는 4 일간 공동 처리에 의해 감소된 증식을 나타내었는데, 이때 4+3 처리 스케줄과 7 일간 공동 처리 조합에의 응답은 더 커졌다(표 1). 세포들을 프레드니솔론으로 전처리한 다음, 화합물 44 및 프레드니솔론으로 공동 처리하였을 때 세포주들 중 오로지 하나만이 복합 이익을 나타내었는데, 이는 약물 첨가 순서가 상승효과에 중요함을 암시하는 것이다(표 1).

[0171] [표 1]

화합물44/GRag 조합은 EZH2 Y646(Y641) 세포주에서 EZH2i 감수성을 증가시켰고,

EZH2i에 내성인 세포주에서 EZH2i 비감수성을 극복하였다.

세포주	4일 Cpd44 IC ₅₀ (uM)		7일 Cpd44 IC ₅₀ (uM)		
	Cpd44 단독처리	Cpd44 공동처리	4일 Cpd44 Pre/ 3일 공동처리	4일 Pred Pre/ 3일 공동처리	7일 공동처리
WSU (Y646-Sens)	0.53 +/- 0.014	0.020 +/- 0.021	0.011 +/- 0.0062	>1	0.014 +/- 0.0049
SU-DHL10 (Y646-Sens)	0.64 +/- 0.26	0.0092 +/- 0.0044	0.0027 +/- 0.0013	0.52, >1	0.020 +/- 0.0057
RL (Y646-Res)	>1	0.0096 +/- 0.0066	<<0.004	0.38	<0.004
SU-DHL4 (Y646-Res)	>1	>1, 0.2, >1	0.035 +/- 0.043	>1	0.51 +/- 0.35
DOHH2 (WT)	>1	0.20 +/- 0.25	>1, 0.03, >1	>1	0.34 +/- 0.078
OCI-LY19 (WT)	>1	0.19 +/- 0.11	0.0055 +/- 0.0047	>1	0.026, <0.004

[0172]

이와 같은 세포주들에서 화합물 44와 GRag의 관찰된 복합 이익의 원인인 잠재적 기작들을 평가하기 위해, 본 발명자들은 프레드니솔론 처리가, 이 프레드니솔론 단독 처리 또는 화합물 44와의 조합 처리한지 4 일 후, WSU-DLCL2, OCI-LY19 및 RL 세포 내 H3K27의 전반적인 메틸화 및 아세틸화에 영향을 미쳤는지 여부를 확인하였다(2 회의 독립적인 실험을 통해 이루어짐). 단일 제제인 프레드니솔론은 WSU-DLCL2 세포 또는 RL 세포에서 H3K27Me3 수준에 영향을 미치지 않았지만, OCI-LY19 세포에서는 높은 용량으로 3K27Me3 수준을 증가시켰다(도 9a). 프레드니솔론 비감수성 EZH2 돌연변이체 주들의 경우와는 대조적으로, 프레드니솔론에 대한 OCI-LY19 세포의 높은 감수성으로 말미암아, 더 낮은 프레드니솔론 용량이 OCI-LY19 세포 처리에 필요하였다. 프레드니솔론의 포함은 어떠한 세포주에서도 H3K27Me3 억제에 대한 화합물 44 IC₅₀을 변경하지 않았다(도 9a). 이와 유사하게, 전반적인 H3K27 아세틸화 수준은 프레드니솔론 단독 또는 화합물 44와 프레드니솔론의 조합에 의해 영향받지 않았다(도 9b, 도 9c 및 도 9d).

H3K27 아세틸화 또는 삼메틸화의 전반적인 수준은 영향받지 않았음이 발견되었는데, 이를 기반으로 GR 신호전달 경도들의 전사 조절을 연구하였다. WSU-DLCL2, SU-DHL10, RL, SU-DHL4, OCI-LY19 및 DOHH2 세포들을 단일 농도의 화합물 44, 프레드니솔론 또는 이의 조합으로 4 일 동안 처리하였으며, 유전자 발현을 글루코코르티코이드

신호전달 PCR 어레이를 사용하여 분석하였다(표 4a 내지 4f). 전반적으로, 모든 세포주에서 프레드니솔론 처리 및 조합 처리 둘 다가 행하여졌을 때 더 많은 수의 유전자가 하향 조절되었는데, 이는 GR의 유전자 발현 활성인자 및 억제인자 둘 다로서의 역할을 암시한다. 본 실시예에서는 GR의 활성화 기능에 초점을 맞추었으며, 세포주 패널에서 조합 처리시 상승적 상향 조절이 일어난 3 개의 유전자를 기술하였다. 세스트린(SESN1), 즉 mTOR 신호 전달을 억제하는 추정 중앙 억제 인자(ref)는 통상, EZH2 WT 세포주에서가 아닌, 4 개의 EZH2 돌연변이 세포주 가운데에서 조합 처리에 의해 상승적 방식으로 상향 조절되는 유전자로서 동정되었다(도 8의 A 및 표 2). TNF 발현은 2 개의 EZH2 돌연변이체, 화합물 44 비감수성 세포주(SUDHL4) 중 하나에서만 상승적으로 상향 조절되었는데, 이 경우 기타 EZH2 돌연변이체, 화합물 44 비감수성 세포주(RL)도 동일한 결과를 나타내는 경향이 있었다(도 8의 B 및 표 2). TSC22D3/GILZ의 발현은, 프레드니솔론에 의해 모든 세포주에서 상향조절되었지만, EZH2 돌연변이체, 화합물 44 감수성 세포에서는 오로지 상승적으로 증가한다(도 8의 C 및 표 2).

[0175] [표 2]

도 8에 제시된 유전자 발현 데이터의 통계학적 분석

세포주	비교	세스트린		TNF		GILZ	
		P 값	P 값 요약	P 값	P 값 요약	P 값	P 값 요약
OCI-LY19	DMSO vs 조합	0.9164	ns	0.0071	**	0.0075	**
OCI-LY19	EPZ-6438 vs 조합	0.3232	ns	0.1553	ns	0.0326	*
OCI-LY19	프레드니솔론 vs 조합	0.1486	ns	0.5050	ns	0.6353	ns
DOHH2	DMSO vs 조합	0.0063	**	0.0589	ns	0.0056	**
DOHH2	EPZ-6438 vs 조합	0.0186	*	0.1401	ns	0.0071	**
DOHH2	프레드니솔론 vs 조합	0.557	ns	0.1000	ns	0.2828	ns
WSU-	DMSO vs 조합	<0.0001	****	0.0001	***	<0.0001	****

[0176]

DLCL2							
WSU-DLCL2	EPZ-6438 vs 조합	<0.0001	****	0.3813	ns	<0.0001	****
WSU-DLCL2	프레드니솔론 vs 조합	<0.0001	****	0.9483	ns	0.0001	***
SUDHL10	DMSO vs 조합	0.0073	**	0.0058	**	0.0102	*
SUDHL10	EPZ-6438 vs 조합	0.0081	**	0.0050	**	0.0076	**
SUDHL10	프레드니솔론 vs 조합	0.0126	*	0.1159	ns	0.0236	*
RL	DMSO vs 조합	0.0449	*	0.0529	ns	0.0623	ns
RL	EPZ-6438 vs 조합	0.0484	*	0.0639	ns	0.0635	ns
RL	프레드니솔론 vs 조합	0.2329	ns	0.0997	ns	0.5716	ns
SUDHL4	DMSO vs 조합	0.0033	**	0.0043	**	0.0275	*
SUDHL4	EPZ-6438 vs 조합	0.0045	**	0.0059	**	0.0196	*
SUDHL4	프레드니솔론 vs 조합	0.010	*	0.0205	*	0.0107	ns
양측 꼬리 검정에 의해 쌍별 통계학적 비교들을 수행하였다.							
ns: 유의적이지 않음; * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001;							
**** p < 0.0001							

[0177]

[0178]

그 다음, 본 발명의 발명자들은 SUDHL10 이종이식편 모델 내에서 화합물 44와 프레드니손의 28 일간 조합 투여에 대해 조사하였는데, 이때 2 차례의 상이한 스케줄로 화합물 44 또는 프레드니손을 2 차례 투여하였다(Pred-1 = 제1 일 내지 제5 일 및 제22 일 내지 제26 일에 프레드니손 0.15 mg/kg BID × 5; Pred-2 = 프레드니손 0.15 mg/kg BID 그 다음, 본 발명의 발명자들은 SUDHL10 이종이식편 모델 내에서 화합물 44와 프레드니손의 28 일간 조합 투여에 대해 조사하였는데, 이때 2 차례의 상이한 스케줄로 화합물 44 또는 프레드니손을 2 차례 투여하였다(Pred-1 = 제1 일 내지 제5 일 및 제22 일 내지 제26 일에 프레드니손 0.15 mg/kg BID × 5; Pred-2 = 프레드니손 0.15 mg/kg BID × 28). 시험관 내 데이터에 의해 제안되는 바와 같이, 프레드니손 단독 투여는 어떠한 유의적 항종양 효과도 유도하지 않았다(도 20의 B). 앞선 연구와 유사하게, 화합물 44의 125 mg/kg BID(1 일 2 회) 투여는 단지 부분 응답만을 나타내었지만, 2 회차의 주기에 걸친 프레드니손 치료계획에 의한 투여가 아닌, 화합물 44와 프레드니손의 공동 투여(0.15 mg/kg BID)는, 화합물 44만을 고용량으로 단독 투여하였을 때 달성되는 최대 가능 퇴행을 유도하였다. 모든 마우스의 체중은 도 20의 C에 나타내어져 있다.

[0179]

SUDHL10(EZH2 Y646F) 이종이식편 보유 마우스를, 본 방법에서 지정된 바와 같이, 화합물 44, COP(독소루비신 성분을 포함하지 않는 화학요법), 또는 이것들의 조합으로 28 일 동안 처리하였다. 28 일째 되는 날 안락사된 16 마리 마우스 중 8 마리 마우스에서 구하여진 평균 종양 무게들을 비교하였는데, 이로써 그룹 간 종양 무게에 유의적 차이가 있음이 입증되었다(* p < 0.05, ** p < 0.01, **** p < 0.0001; 양측 t 검정). B) SUDHL10(EZH2 Y646F) 이종이식편 보유 마우스에 2 차례의 상이한 스케줄로 화합물 44 또는 프레드니손을 2 차례 투여하였다(Pred-1 = 제1 일 내지 제5 일 및 제22 일 내지 제26 일에 프레드니손 0.15 mg/kg BID × 5; Pred-2 = 프레드니손 0.15 mg/kg BID × 28). 상기 두 화합물을 또한 지정된 바와 같이 조합 투여하였다. 평균 종양 부피 ± SEM (n=10)을 맨위 패널에 플롯 작성하였다. EPZ-6438이 투여된 모든 그룹들은 종양 성장에 있어 통계학적으로 유의적인 감소를 나타내었던 반면에(적어도 p < 0.01, vs. 비이를 또는 프레드니손 단일 제제, 상기 두 스케줄에 따름; 반복된 측정치의 ANOVA, Dunnett 사후 검정), 프레드니손 단일 제제는 비이클에 비교되었을 때, 어떠한 유의적 항종양 효과도 유도하지 않았다(도 28). 시험관 내 데이터에 의해 제안되는 바와 같이, 프레드니손 단독 투여는 어떠한 유의적 항종양 효과도 유도하지 않았다(도 20의 B). 앞선 연구와 유사하게, 화합물 44의 125 mg/kg BID(1 일 2 회) 투여는 단지 부분 응답만을 나타내었지만, 2 회차의 주기에 걸친 프레드니손 치료계획에 의한 투여가 아닌, 화합물 44와 프레드니손의 공동 투여(0.15 mg/kg BID)는, 화합물 44만을 고용량으로 단독 투여하였을 때 달성되는 최대 가능 퇴행을 유도하였다. 모든 마우스의 체중은 도 20의 C에 나타내어져 있다.

[0180]

SUDHL10(EZH2 Y646F) 이종이식편 보유 마우스를, 본 방법에서 지정된 바와 같이, 화합물 44, COP(독소루비신 성분을 포함하지 않는 화학요법), 또는 이것들의 조합으로 28 일 동안 처리하였다. 28 일째 되는 날 안락사된 16 마리 마우스 중 8 마리 마우스에서 구하여진 평균 종양 무게들을 비교하였는데, 이로써 그룹 간 종양 무게에 유의적 차이가 있음이 입증되었다(* p < 0.05, ** p < 0.01, **** p < 0.0001; 양측 t 검정). B) SUDHL10(EZH2 Y646F) 이종이식편 보유 마우스에 2 차례의 상이한 스케줄로 화합물 44 또는 프레드니손을 2 차례 투여하였다(Pred-1 = 제1 일 내지 제5 일 및 제22 일 내지 제26 일에 프레드니손 0.15 mg/kg BID × 5; Pred-2 = 프레드니손 0.15 mg/kg BID × 28). 상기 두 화합물을 또한 지정된 바와 같이 조합 투여하였다. 평균 종양 부피 ± SEM (n=10)을 맨위 패널에 플롯 작성하였다. EPZ-6438이 투여된 모든 그룹들은 종양 성장에 있어 통계학적으로 유의적인 감소를 나타내었던 반면에(적어도 p < 0.01, vs. 비이를 또는 프레드니손 단일 제제, 상기 두 스케줄에 따름; 반복된 측정치의 ANOVA, Dunnett 사후 검정), 프레드니손 단일 제제는 비이클에 비교되었을 때, 어떠한 유의적 항종양 효과도 유도하지 않았다.

[0181]

[표 3]

화합물 44와의 조합에 관한 요약

세포주		EZH2 돌연변이체 GCB			EZH2 WT GCB			
		WSU-DLCL2	SU-DHL10	SU-DHL6	DOHH2	SU-DHL5	OCL-LYs 19	Toledo
C 마포스파미드	부가적	부가적	부가적	효과없음	--	--	효과없음	
H 독소루비신	상승효과	부가적	부가적	효과없음	--	--	효과없음	
O 빙크리스틴	부가적	부가적	부가적	효과없음	--	--	효과없음	
P 프레드니솔론	상승효과	상승효과	상승효과	상승효과	상승효과	상승효과	효과없음	
덱사메타손	상승작용	상승작용	상승작용	상승작용	상승작용	상승작용	효과없음	

[0182]

[0183]

마지막으로, 3 개의 상이한 EZH2 돌연변이체 림프종 이종이식편 모델에서 종양 성장 억제를 평가하였다. 림프종 이종이식편을 피하 이식한 누드 마우스 또는 SCID에 화합물 44와 화학요법제, 즉 CHOP 또는 COP(단, CHOP는 독소루비신을 포함하지않음)를 공동 적용하였으며, 그 결과를 단일 제제 처리시와 비교하였다. WSU-DLCL2 이종이식편 보유 마우스에서, 화합물 44의 모든 용량 및 적용된 스케줄에서 종양 성장 억제가 달성되었으며, 그 결과는 CHOP 화학요법 단독 적용시보다 더 우수하였다(도 7a). 뿐만 아니라, 화합물 44와 CHOP의 병용 요법은 확고한 항종양 응답과, 단일 제제만이 단독 투여된 경우의 종양 성장 억제(CHOP 및 화합물 44에 대해 각각 45% 및 71%)보다 유의적으로($p<0.001$) 우수한 종양 성장 억제(93%)를 유도하였다. 모든 단일 처리들은 관용되었는데; 제1 차 주기 이후 화합물 44/CHOP 조합 처리/적용 그룹의 경우 미미한 체중 감소가 일어났고(11.3%), 그 후 본 처리의 다음 회차 주기가 시작되기 전 마우스는 회복하였다.

[0184]

SU-DHL6 이종이식편 모델에서, EZH2 억제제 GSK503을 사용하여, Beguelin와 다수에 의해 이전에 발표된 결과들과는 대조적으로, CHOP 단독 적용시 또는 화합물 44 처리시 유의적 종양 성장 억제가 관찰되지 않았다(도 7b, 맨위 패널). 놀랍게도 화합물 44/CHOP 조합은 종양 퇴행을 초래하였다. 28 일째 되는 날 투여가 중단되고 나서 60 일째 되는 날, 마우스를 대상으로 종양 성장 지연이 관찰되었을 때, 상기와 같은 조합은 마우스의 58%에서 무종양 생존을 달성하였다(도 7b, 맨 아래 패널).

[0185]

CHOP의 독소루비신 성분은, 자체의 심장 독성으로 말미암아 생애 누적 용량 한계(lifetime cumulative dosing limit)가 $550\text{mg}/\text{m}^2$ 미만이다. 그러므로, 상기 성분이 배제되었을 때의 화합물 44/화학요법 치료계획의 복합 이익이 관찰되었다. 제3차 연구에서, SU-DHL10 이종이식편 보유 마우스에서 화합물 44(BID)의 용량을 점차 증가하거나, 독소루비신 불포함 화학요법 치료계획(COP)을 적용하거나, 또는 COP와 화합물 44의 조합을 적용하면서 28 일 동안 처리하였다. 화합물 44의 모든 용량에서 COP를 적용하면서 종양 성장 억제가 관찰되었다(도 7c, 맨위 패널). 266 mg/kg, 532 mg/kg 및 COP/화합물 44 조합 처리는, 측정치에 대한 반복된 ANOVA 및 Dunnett'사후 검정에 의해 평가되는 바와 같이, 비이클이 투여되었을 때와 통계학적으로 상이한 퇴행을 초래하였는데($p>0.001$), 이 경우 화합물 44/COP 조합 그룹은 최선의 전체 응답을 나타내었다. 투여후/적용후 28 일 경과시, 종양 크기가 가장 작았던 마우스 하위 그룹(그룹당 마우스 8마리)은 종양 성장 지연 종말점에 상기 화합물 44/COP를 추가로 투여/적용하지 않고서도 여전히 살아있었다. 화합물 44로 처리한 마우스의 경우에는 뚜렷한 용량 의존적 종양 성장 지연 이익이 달성되었던 반면에, COP 적용된 종양들은 화합물 44로 처리한 종양들보다 더 빠르게 진행되었다(도 7c, 중간 패널). 최대 허용 용량의 화합물 44로 처리하거나 또는 화합물 44/COP를 조합 처리한 마우스는 제60 일에 100% 생존율을 나타내었음과 아울러, 조합 그룹은 최소의 최종 종양 무게를 나타내었는데, 이는 화합물 44에 대한 최대 허용 용량이 적용된 기타 모든 처리 그룹들과는 통계학적으로 상이한 결과였다($p>0.05$)(도 7c, 맨 아래 패널).

[0186]

B 세포 NHL에 대한 표준 치료는, 사이클로포스파미드, 독소루비신, 빙크리스틴 및 프레드니솔론으로 구성된 병용 화학요법 치료계획이다. 완전 응답 비율 40% 내지 50%가 달성될 수 있을 때, 상당 비율의 환자들에서는 상기

B 세포 NHL이 재발하였는데, 이 경우 3년간의 전체 생존률은 약 30%에 불과하였다. 재발된 림프종은 광범위한 항암 약물에 내성을 나타낼 수 있는데, 이 내성은 이와 같은 공격적 악성종양을 다스리기 위한 임상에 있어서 심각한 도전이 된다. 림프종에 있어서 약물 내성 획득은 부분적으로 종양 세포의 불안정성과 유전적 이질성에 의해 유도된다. 그러므로, 약물 내성 NHL의 성공적 치료는 B 세포 NHL의 상이한 아형들에 특이적인 다수의 경로들을 표적화하는 약물들의 협력적 조합이 필요할 것이다. 예를 들어 활성화된 B 세포류의 림프종에 있어서, NFkB 경로의 구성적 활성화는 요법의 내성에 연루되었고, 몇몇 신규 표적 요법들은 이러한 아형에 희망을 나타내었다.

[0187]

후성적 효과기, 예를 들어 폴리콤(polycomb)도 또한 암 세포 약물 내성에 연루되었다. EZH2, 즉 폴리콤 억제 복합체 2(polycomb repressive complex 2; PRC2)의 촉매 서브유닛은 배 중심 유래 B 세포 림프종에서 중요한 발암 구동 인자이다. 이와 같이 더 원시적인 B 세포 악성종양들, 특히 변경된 촉매 활성을 가지는 EZH2 돌연변이체 발현 변이체는 증식 및 생존을 위해 EZH2를 필요로 한다. 전임상 연구들로부터 얻어진 결과들은, 이와 같이 유전적으로 정의된 암의 치료를 위한 EZH2 촉매 억제제에 대해 지대한 가능성을 예측하고, EZH2 억제제는 또한 화학요법 내성을 경감시킬 수도 있다. 본원에 제시된 데이터는, 화합물 44, 즉 임상 단계의 EZH2 억제제가 CHOP 성분들로 인한 다양한 정도의 복합 이익(부가작용 내지 상승효과)을 나타냄을 제시하였다. 이와 같은 복합 효과들은 특히 배 중심 기원의 림프종에서 발견되었는데, 사이클로포스파미드, 독소루비신 및 빙크리스틴의 경우에는 EZH2 돌연변이체 보유 세포에 제한되었다. 림프종 세포 사멸에 있어서 유의적인 상승효과는 또한 화합물 44를 CHOP와 함께 생체 내 적용할 때 발견되었다. 이는, 단일 제제가 어떠한 유의적 항종양 활성을 나타내지 않았을 뿐만 아니라, 조합이 50% 초과의 마우스에서 지속적인 퇴행을 유도하지 않았던 SU-DHL6 이종이식편 모델에서 특히 그랬다. 이는, EZH2 돌연변이체 림프종의 약물내성에 있어서 과활성인 EZH2의 잠재적 중요성을 강조해주는 것이다. CHOP 성분들 가운데 화합물 44와 프레드니손의 조합은 가장 강력한 항증식 활성을 유도하였으며, 이 조합은 또한 EZH2 돌연변이 상태와는 상관없이, 비감수성 GCB 림프종 세포주를 EZH2 억제에 감수성이 되도록 만들 수 있었다. 부가적으로, 이러한 복합 이익은, 화합물 44와 프레드니솔론을 동시에 투여하거나, 특이적 양태의 순서로 투여할 때 더 분명해지는데; 세포를 EZH2 억제제로 프라이밍한 다음, GR 작동제로 처리하면 특히 효과적인 것으로 판명되었다. 이와 같은 놀라운 발견은 임상에서 EZH2 억제제들의 적용에 대해 잠재적으로 중요한 함축성을 가진다. 첫째, 널리 사용된 GRag는 종종 항암 약물들과 공동 투여되어, 약물 유도성 알레르기 반응을 예방하고, 통증, 오심 및 구토를 완화하며, 이와 같은 암에서 세포자살을 유도하는 능력으로 말미암아 조혈 세포 악성종양 치료의 중심이 된다. 기타 CHOP 성분들과 비교되며, GRag는 최소한의 심각한 부작용을 유발한다. 또한, SU-DHL10 이종이식편 모델의 데이터에 의해 시사되는 바와 같이, 화합물 44에 의한 복합 이익이 보존되면서 CHOP 치료계획으로부터 독소루비신이 배제되는 기회는, 환자를 독소루비신의 용량 제한 심장 독성 부작용으로부터 보호할 수 있었다. 마지막으로, 전임상 연구들은, 단일 제제 EZH2 억제제가, 충족되지 않는 임상 요구사항이 많은 GCB 림프종 환자들의 일부(20%)를 대표하는 EZH2 돌연변이체 보유 림프종 환자들에서만 유의적 세포 사멸을 유도함을 나타내었다. 이때의 결과들은 GRag/EZH2 억제제 조합들이 모든 배 중심 유래 B 세포 림프종에서 임상학적 유용성을 가질 수 있음을 말해주는 것이다.

[0188]

글루코코르티코이드 결합 GR 분자들은 핵으로 이동하여, 세포 환경에 따라서 전사 활성인자로서의 역할 또는 전사 억제인자로서의 역할을 할 수 있다. GR은 생산적 상호작용에 대하여 뉴클레오좀을 꾸준하게 샘플링하고, 크로마틴 변형 효소의 목적은 GR, 이의 보조인자 및 DNA에 대한 기저 전사 기구의 조절된 접근통로를 제공하는 것임이 제안된 바 있다. 기타 연구들은, GR이 종종 개방 크로마틴의 기존 영역들에 결합하고, 소정의 세포류 내 크로마틴 구조는, 이 GR이 조직 특이적 방식으로 작용을 할 수 있도록 조직화됨을 나타낸다. GR 결합 위치들에 대한 접근 가능성은 ATP 의존적 크로마틴 리모델링에 의해 추가로 증가될 수 있으며, SWI/SNF 복합체는 이와 같은 활성에 중요한 역할을 담당한다. 특정 이론 또는 구체적인 작용 기작에 구속되고자 하는 것은 아니지만, H3K27의 EZH2 매개 과메틸화에 의해 유도된 이상 크로마틴 억제는, 정상적인 GR 매개 유전자 유도 또는 억제를 방해하지 않고, 달리 접근 가능한 GR 결합 위치들 중 일부를 차단할 수 있음이 상상될 수 있다. 정말로 모든 EZH2 돌연변이체 림프종 세포주들은 GRag 처리에 비감수성인 반면에, 농도 의존적 세포 사멸은 EZH2 WT 세포들에서 관찰된다. 프레드니솔론 전처리 후 화합물 44 처리가 행하여지면, 테스트된 거의 모든 세포주에서 상승효과를 유도할 수 없다는 관찰은, EZH2 억제제가, GR의 강화된 작용에 대한 속도 제한 단계인 크로마틴 리모델링을 유도하였을 가능성을 지지하고 있다. 또한, PRC2는 SWI/SNF 기능에 길항작용을 하는 것으로 알려져 있으며, SWI/SNF 복합체 중심 서브유닛들(SMARCA4, ARID1A 및 INI)의 하향조절은 급성 림프아구성 T 세포 백혈병에서 프레드니솔론에 대한 내성과 연관지어졌다. INI1 상실과 EZH2 과활성화의 관계가 간상소체 종양에서 확립되었으므로, 전반적인 INI1 단백질 수준이, SWI/SNF 기능 증가후 GR의 자체 결합 위치들에 대한 더 큰 접근가능성을 잠재적으로 허용하는 화합물 44 또는 프로드니솔론에 노출된 다양한 림프종 세포 내에서 증가할지 여부가 관찰되

었다.

[0189] GR 경로 유전자 발현 어레이에는, 몇몇 GCB 림프종 세포(EZH2 WT 및 돌연변이체 둘 다)를 화합물 44, 프레드니솔론 또는 이것들의 조합으로 처리한 후의 증가된 유전자 발현 및 감소된 유전자 발현 둘 다를 규명하였는데, 이로써 GR의 이중 기능이 확인되었다. 모든 EZH2 돌연변이체 림프종 세포에서 조합에 의해 상승적으로 상향조절되는 유일한 유전자는 SESN1, 즉 DNA 손상 및 산화 스트레스에 대한 세포 응답을 유발하는 TP53 종양 억제인자였다. 세스트린은, AMP-활성화 단백질 키나아제를 활성화하여 mTOR 경로의 억제를 초래함으로써 세포 성장을 억제한다. 그러므로, SESN1 매개성 mTOR 경로 억제는 화합물 44 처리후 EZH2 돌연변이체 림프종 세포에 있어서 GRag 감수성을 다시 도입하는 중요한 기작일 수 있다.

[0190] 역으로, GRag/화합물 44 조합 처리는 또한, EZH2 억제제 처리에 난치성인 것으로 보고된 EZH2 돌연변이체 림프종 세포주들(RL, SU-DHL4)에서 세포사멸을 유도할 수도 있었다. SESN1은 이와 같은 세포주들에서 역시 조합 처리로 유도되었지만, 부가적으로 TNF, 즉 유력한 염증 시토킨의 상승적 상향조절이 RL 세포 및 SU-DHL4 세포에서 특이적으로 관찰되었다. TNF 및 글루코코르티코이드는 보통 길항 작용을 하므로, 이와 같은 관찰은 놀라워 보인다. TNF는 이의 수용체 TNFR-1을 통해서 세포자살을 유도할 수 있지만, 또한 주로 NFkB 경로를 통해 생존 신호를 전달하는 능력도 가진다. 그러므로, 화합물 44/프레드니솔론 조합에 의해 유도된 TNF 발현 증가는 NFkB-매개 전사의 GR 작동체 억제가 진행되는 중에 세포자살을 향한 TNF 작용을 변동시킬 수 있다. 하지만, 이러한 기작이 왜 화합물 44 비감수성 EZH2 돌연변이체 세포 내에서 상승적 세포 사멸을 초래하는지는 명확하지 않다. GRag 내성에 있어서 NFkB 경로 중 네거티브 조절인자들의 이상 억제와, 이를 매개하는 EZH2의 잠재적 역할의 잠재적인 중요성은, GILZ가, 조합 처리된 세포주 6 개 중 2 개에서 상승적으로 상향조절되었다는 본 발명자들의 관찰에 의해 추가로 뒷받침된다.

방법

중간 처리량 분석법

[0193] 림프종 세포들을 플라스크에 접종하였으며(WSU-DLCL2 및 DOHH2의 경우 50,000 개 세포/mL, SU-DHL10의 경우 10,000 개 세포/mL, 그리고 Toledo의 경우 100,000 개 세포/mL), Toledo 분석을 위해 화합물 44 또는 DMSO를 4 일 또는 6일 동안 7 회 투여하여 전처리하였다. 이후, 세포들을 다시 WSU-DLCL2 및 DOHH2에 대해서는 50,000 개 세포/mL로, 또는 SU-DHL-10에 대해서는 30,000 개 세포/mL로 나누었으며, 이후 HP D300 디지털 분배기(Tecan)를 사용하여 화합물 44와 관심있는 화합물로 공동 처리하였다. 상기 두 약물들은 연속으로 2 배 희석하였으며, 평판 전체에 걸쳐 진단상 일정한 비율로 매트릭스 내에서 합하였다(이때 최종 DMSO 함량은 0.11%(v/v)). 공동 처리시로부터 3 일(Toledo 분석을 위한 경우에는 5 일) 경과후, ATP 함량을 통해 CellTiter-Glo[®] (Promega)를 이용하여 세포의 자생력을 측정하였으며, 발광도는 SpectraMax M5 미세평판 판독기(Molecular Devices)를 사용하여 확인하였다.

[0194] 약물 조합에 대한 상승 효과의 정량은 Chou-Talalay 방법을 사용하여 수행한다(Ref 1). 복합 지수(CI) 등식은 부가작용(CI=1), 상승 효과(CI < 1) 및 길항작용(CI > 1)에 대한 정량적 정의를 제공한다. 이러한 등식은 CI값들을 결정하기 위해 일정한 약물 조합 비로부터 구하여진 분수 효과(fractional effect; Fa)값들을 사용하였다. 이로부터 구하여진 플롯(Fa-CI) 플롯은, 95% 신뢰 구간에 의해 팔호 안에 제시된 결과의 CI값들을 나타낸다. 이러한 Fa-CI 플롯들은 윈도우즈용 CalcuSyn 소프트웨어를 사용하여 작성한다(Ref 2). 신뢰 구간 선들도 1 이하인 1 미만의 CI값들은 통계학적으로 유의적인 상승 효과를 말해준다.

[0195] 오로지 하나의 약물만이 50%를 초과하는 억제율을 나타내었던 약물 조합에 대해 효능 변동이 측정되었다. 용량 응답들은 Graphpad Prism을 사용하여 플롯으로 작성하였으며, 50% 억제 농도 또는 60% 억제 농도 중 어느 하나는 용량 응답 곡선으로부터 내삽하였다. 용량 응답에 대한 신뢰 구간이 중첩되지 않았을 때, 효능 변동은 유의적인 것으로 간주되었다.

세포주, 화합물 및 치료의 개요

[0197] WSU-DLCL2, SU-DHL10, RL, SU-DHL4, OCI-LY19 및 DOHH2는 이미 기술되어 있다(NatChemBio 2012). 조합 연구를 위해, 문헌[Daigle et al, Cancel Cell, Vol. 20, 1. Pg. 53-65 (2011); Daigle et al., Blood, 121, 13, 2533-2541 (2013)]에 이미 기술된 바와 같이 혼탁 세포들 중 본 발명자들의 증식 분석법의 변법을 사용하였다. 간단히 말해서, 제0 일에 세포들을 초기 밀도로 96 웰 평판들에 3 회 반복하여 도말하였으며, 그 결과 4 일에 걸친 선형 대수기 성장이 보장되었다. 세포들을, 약물 투여후 4 일째 되는 날의 IC50보다 10 배 낮은 농도에서 화합물 44의 용량 곡선(최고 용량 1 ?M로부터 시작), 프레드니솔론 단일 용량(카탈로그 # 및 제조자)으로 처리

하였거나, 또는 화합물 44와 프레드니솔론의 조합으로 처리하였다. 4 일째 되는 날, 세포들을 구아바 easyCyt™ 유동 세포분석기 내에서 Viacount 시약을 사용하여 계수하였으며, 살아있는 세포의 수는 3 일 더 세포를 재도말하여 원래 밀도로 만드는데에 사용하였다. 화합물 44로 전처리된 세포들에는 이후, 화합물 44만을 연속으로 투여하였거나, 또는 화합물 44와 프레드니솔론의 조합을 (일정한 용량으로) 투여하였고; 프레드니솔론으로 전처리된 세포들에는 이후, 프레드니솔론을 연속으로 투여하였거나, 또는 프레드니솔론과 화합물 44의 조합을 투여하였는데; 4 일 동안 공동 처리된 세포들에는 이후로도 계속해서 7 일 동안 공동 처리하였다.

[0198] 이종이식편 연구

본 연구에서 동물 취급, 보호 및 처리와 관련된 모든 절차들은 국제 실험동물 관리평가 인증 협회(AAALAC)의 가이드라인에 따라서 CRL Piedmont 및 Shanghai ChemPartner의 실험동물 운영 위원회(IACUC)에 의해 승인된 가이드라인에 의해 수행하였다. WSU-DLCL2, SU-DHL6 또는 SU-DHL10 세포들을 중간 대수기 성장(mid-log phase growth)이 진행되는 동안에 수득하여, 50% Matrigel™(BD Biosciences)을 포함하는 PBS 중에 재현탁하였으며, 이후 면역 약화된 마우스에 주사하였다. 각각의 마우스에는 1?10⁷ 개 세포(세포 혼탁액 0.2 mL)를 피하 투여하였으며(우측 옆구리), 일단 종양들이 소정의 크기에 도달하면 마우스에는 상이한 용량의 화합물 44를 다양한 스케줄에 따라서 28 일 이하의 기간 동안 경구 투여하였고/투여하였거나 CHOP/COP는 다음 스케줄에 따라서 적용하였다: 사이클로포스파미드는 복막 내(i.p.) 투여하였고, 독소루비신과 빙크리스틴은 각각 꼬리 정맥에 볼루스 주사(i.v.)를 통해 투여하였으며; 상기 각각의 약물들은, SU-DHL6 연구의 경우에는 제1 일과 제8 일에, 그리고 WSU-DLCL2 연구 및 SU-DHL10 연구의 경우에는 제1 일과 제22 일에 매일 1 회 투여하였다. 프레드니손은, SU-DHL6 연구의 경우 제1 일 및 제8 일을 시작으로((qd?5)?2, 제1 일, 제8 일), 그리고 WSU-DLCL2 및 SU-DHL10 연구의 경우에는 제1 일 및 제22 일을 시작으로((qd?5)?2, 제1 일, 제22 일), 2 회차 주기(매일 투여, 총 5 회)로 p.o. 투여하였다. 각각의 용량은 0.2 mL/20 g 마우스(10 mL/kg)의 부피로 전달하였으며, 마지막으로 기록된 개별 동물의 체중에 대해 조정하였다. 종양에 관한 측정치 및 체중은 모든 연구에 대해 총 28 일 동안 2 주마다 수집하였다. SU-DHL10 연구 및 SU-DHL6 연구에서 종양 성장 지연을 측정하기 위해, 테스트 동물의 신생물 부피가 종말점 부피인 2000 mm³에 도달하였을 때, 또는 연구의 마지막 날(제60 일)에(상기 두 시기 중 어느 것이 먼저 오든지 그 시기에) 각각의 테스트 동물을 안락사시켰다.

[0200] 정량적 PCR

WSU-DLCL2, SU-DHL10, RL, SU-DHL4, OCI-LY19 및 DOHH2 세포들을 DMSO와 함께 1 μM의 화합물 44, 4 일 경과시 IC₅₀보다 10 배 낮은 농도의 프레드니솔론 어느 용량 또는 이 약물들의 조합으로 4 일 동안 처리하였다(SU-DHL10은 100 nM 화합물 44로 처리됨). 세포들을 획득하였으며, 총 mRNA는 RNeasy Plus Mini Kit(Qiagen; 74134)를 사용하여 세포 펠릿으로부터 추출하였다. RT2 First Strand Kit(Qiagen; 330401)에 의해 RT2 글루코코르티코이드 신호전달 PCR 어레이(Qiagen; PAHS-154ZE-4)용 cDNA를 제조하였다. RT2 SYBR Green ROX qPCR Mastermix(Qiagen; 330521)가 담긴 ViiA 7 실시간 PCR 시스템[Applied Biosystems(AB)]을 사용하여 어레이 RT-PCR을 수행하였다. 유전자 발현을 어레이의 B2M에 대해 정규화하였으며, DMSO 투여시와 비교된 배수 변화는 Ct Ct 방법을 사용하여 산정하였다. 어레이 데이터를 입증하기 위해 세스트린(AB; Hs00902787_m1) 및 TNF(AB; Hs01113624_m1)에 대한 TaqMan Fast Advanced Master Mix(AB; 4444964) 및 TaqMan 프라이머/프로브 세트가 사용되는 TaqMan 프로브 기반 qPCR을 수행하였다. 배수 변화는 상기한 바와 같이 산정하여, RPLPO(AB; 4333761F)에 대해 정규화하였다.

[0202] ELISA

상기 기술된 바와 같이 종양 시료들로부터 히스톤을 추출하였다. 히스톤을 코팅 완충액(PBS + 0.05% BSA)중 농도와 동일한 농도로 제조하였으며, 그 결과 시료 1 μl당 0.5 ng의 농도로 하였고, 시료 또는 표준 100 μl가 2 개의 96 웰 ELISA 평판(Thermo Labsystems, Immulon 4HBX #3885)에 2 회 반복 첨가하였다. 상기 평판들을 밀봉하여 4°C에서 밤새 항온처리하였다. 그 다음날, 평판들은 Bio Tek 평판 세정기에서 300 μl/웰의 PBST(PBS + 0.05% Tween 20; 10X PBST, KPL #51-14-02)로 3 회 세정하였다. 평판들은 300 μl/웰의 희석제(PBS + 2% BSA + 0.05% Tween 20)로 차단한 후, RT에서 2 시간 동안 항온처리하였으며, 이후 PBST로 3 회 세정하였다. 모든 항체들을 희석제 중에 희석하였다. 100 μl/웰의 항 H3K27me3(CST #9733, 50% 글리세롤 스톡 1:1,000) 또는 항 총 H3(Abcam ab1791, 50% 글리세롤 1:10,000)을 각 평판에 첨가하였다. 평판들은 RT에서 90 분 동안 항온처리한 후 PBST로 3 회 세정하였다. 100 μl/웰의 항 Rb-IgG-HRP(Cell Signaling Technology, 7074)는, 1:2,000의 비율로 H3K27Me3 평판에, 그리고 1:6,000의 비율로 H3 평판에 첨가하였으며, 이후 RT에서 90 분 동안 항온처리하였다. 평판들을 PBST로 4 회 세정하였다. 검출을 위해 100 μl/웰의 TMB 기질(BioFx Laboratories, #TMBS)을 첨가

하였으며, 평판들은 RT의 암실에서 5 분 동안 항온처리하였다. 100 μ l/웰의 1N H_2SO_4 를 사용하여 반응을 중지시켰다. 450 nm에서의 흡광도를 SpectraMax M5 미세평판 판독기에서 판독하였다.

[표 4a]

유전자	DMSO	Ct ₂₁	ACT (B26)		GAP44		Pred	
			Pre ₁	Pre ₂	Pre ₃	Pre ₄	Pre ₅	Pre ₆
ANXA1	34.373	23.793	24.545	24.333	7.368	7.319	5.735	5.737
ANXA2	33.574	23.780	23.692	21.613	4.569	4.265	4.467	4.008
AP12	20.360	20.497	20.659	20.655	3.295	3.278	3.232	3.510
ANHPPD3	27.434	28.564	27.537	27.874	10.819	10.819	10.746	10.746
ANGPT14	30.465	30.574	30.333	25.769	13.460	13.155	12.066	12.263
ANXA4	33.319	23.379	24.530	23.394	6.314	6.160	6.593	6.243
AP11	31.992	22.992	22.992	22.992	2.773	2.773	2.773	2.773
AHOD8	22.682	23.537	22.682	22.682	5.082	5.082	5.082	5.082
ASPP1	27.968	27.956	28.894	27.783	10.921	10.921	10.921	10.921
ATFA	38.500	38.538	38.778	38.385	1.685	1.685	1.685	1.685
BC16	27.421	26.460	26.460	26.459	10.416	10.416	10.416	10.416
BMPER	26.616	26.616	26.616	26.616	2.711	2.711	2.711	2.711
CACR	26.674	26.674	26.674	26.674	2.711	2.711	2.711	2.711
CAEP	30.199	29.572	29.572	28.753	13.398	13.398	13.398	13.398
CEPBP	23.119	23.723	24.427	24.618	6.114	6.114	6.114	6.114
CGA482	33.777	33.369	35.003	32.293	15.773	15.773	15.773	15.773
CREB1	23.477	22.697	23.159	22.702	5.471	5.471	5.471	5.471
CREB3	24.768	24.979	25.174	24.863	7.793	7.766	7.747	7.747
CREB3L4	24.162	24.003	24.036	24.497	7.357	7.671	7.538	7.357
CTGF	23.552	23.715	23.715	23.599	20.311	20.552	20.503	20.311
CBP501	26.512	26.512	26.512	26.512	2.711	2.711	2.711	2.711
DDIT4	34.132	33.567	33.551	23.195	7.097	6.338	5.924	5.924
DRAS42	26.162	26.162	26.162	26.162	2.711	2.711	2.711	2.711
DSPP3	20.981	20.800	21.167	21.390	2.711	2.711	2.711	2.711
EDNA1	28.384	28.177	33.433	32.346	2.711	2.711	2.711	2.711
EHOD3	28.384	28.177	28.253	27.256	11.929	13.638	13.026	13.026
ERBB4	23.564	23.499	23.499	23.499	2.711	2.711	2.711	2.711
FKBP5	26.206	26.214	26.168	26.547	9.224	8.995	8.744	8.401
GDFD1	26.444	26.583	27.195	26.808	9.439	9.419	9.569	9.662
GHRHR	37.487	35.643	35.448	36.113	20.462	19.642	19.359	18.347
GHU	23.945	23.285	23.492	22.492	5.911	5.186	5.256	5.745
GOT1	23.694	23.224	23.450	23.450	5.089	6.095	5.333	5.304
H6PQ	26.842	26.842	26.842	26.842	2.711	2.711	2.711	2.711
HAS2	26.442	26.442	26.442	26.442	2.711	2.711	2.711	2.711
HNPBP1	39.845	29.768	30.006	29.439	12.835	12.483	12.293	12.345
HLF	21.0	21.0	21.0	21.0	2.711	2.711	2.711	2.711
IL1RN	33.972	33.972	33.972	33.972	2.711	2.711	2.711	2.711
IL6	26.343	26.343	26.343	26.343	2.711	2.711	2.711	2.711
IL6R	23.178	23.178	23.178	23.178	2.711	2.711	2.711	2.711
IL11	23.416	23.416	23.416	23.416	2.711	2.711	2.711	2.711
IL1F9	28.565	28.545	28.597	27.791	12.541	11.528	10.970	10.545
IL6X	23.344	30.825	32.767	31.604	16.339	15.595	14.163	14.958
MERTRK	29.340	28.743	29.685	28.285	12.335	11.540	12.058	11.739
MTIE	22.845	22.943	22.943	22.943	2.711	2.711	2.711	2.711
M172A	22.845	22.943	22.943	22.943	5.722	5.860	5.671	5.369

[표 4b]

NEKRIA	21.672	31.505	22.337	21.755	4.686	4.710	4.686	0.987	0.971	-0.058	3.841
NR3C1	20.940	21.131	21.276	20.605	3.915	3.912	3.946	-0.312	1.016	-0.285	-0.776
PGC07	23.121	23.359	23.346	23.491	6.140	6.167	6.345	0.544	0.542	0.229	0.553
PGC08	22.163	33.308	35.543	36.932	15.155	16.289	17.923	0.934	0.523	-2.742	4.731
PGD1	26.692	25.788	26.392	25.520	9.087	8.569	8.655	-0.518	1.432	-0.422	1.340
PER1	24.615	25.503	25.500	26.016	7.610	8.284	8.213	0.614	0.627	0.263	3.250
PER2	23.177	23.707	23.022	23.022	5.945	6.030	6.035	0.211	0.211	0.211	0.418
PK3R1	23.375	23.115	23.678	23.117	6.170	5.896	6.051	0.175	1.209	-0.274	1.219
PLD1	22.093	22.093	22.093	22.093	2.211	2.211	2.211	0.211	0.211	0.211	0.211
PLK4P3	30.216	29.694	30.977	30.213	17.875	18.350	18.139	1.666	1.638	-0.072	3.053
POU2F1	24.562	24.655	25.232	24.555	7.542	7.437	7.605	0.100	1.087	0.967	1.108
POU4P2	34.495	34.740	34.543	34.480	14.521	14.955	14.497	0.613	0.379	-0.574	0.483
RA5A3	23.332	23.251	23.743	23.762	6.137	6.032	6.136	-0.25	0.033	0.209	0.695
RA5B2	28.495	27.701	29.467	28.722	11.493	10.482	11.345	0.076	1.936	-0.374	1.399
RHOB	22.108	30.804	20.967	18.653	5.103	3.735	3.340	2.513	-1.378	2.599	-0.586
RHOJ	22.432	22.434	23.126	22.493	5.498	5.405	5.499	0.345	-0.253	1.192	0.031
SE501	26.353	26.107	25.619	24.316	9.346	9.388	9.552	7.670	-0.458	1.374	-1.154
SE502	30.432	31.616	32.246	31.998	12.213	14.016	14.600	-1.105	2.274	2.225	-3.576
SIC10A6	24.878	24.878	25.910	25.274	7.873	8.662	8.283	0.128	-0.211	1.157	0.431
SIC10A2	29.254	29.163	30.512	29.115	12.245	11.882	12.405	11.959	-0.367	1.296	0.236
SIC22A5	28.151	27.477	28.632	28.483	11.346	10.238	11.337	-0.398	1.376	0.119	0.676
SPHK1	28.555	28.787	29.198	29.124	11.550	11.568	11.978	0.018	0.988	0.022	0.878
SPHK1	27.533	27.485	26.097	26.033	12.356	12.746	13.553	-0.347	0.357	0.357	0.652
STAT5A	22.115	22.442	22.673	22.594	5.110	5.723	5.646	0.245	0.113	0.925	1.202
STAT5B	22.886	22.979	23.838	23.297	5.801	5.760	6.311	-0.181	1.037	0.330	0.255
TBL1K1	23.517	21.488	21.705	21.430	4.312	4.636	4.284	-0.303	1.296	-0.234	5.114
TNK	24.163	24.317	24.612	23.320	7.758	7.158	6.985	-0.560	1.516	-0.773	0.193
TSHZP3	22.295	22.637	23.168	23.227	5.281	5.636	5.541	0.317	0.863	0.250	0.643
TCG2D3	25.692	25.255	24.619	24.219	6.687	8.036	8.892	0.671	-1.614	0.338	3.261
USP2	24.856	25.235	25.764	24.989	7.873	8.016	8.337	0.135	0.296	0.270	0.229
USP24	25.992	24.754	24.925	24.651	8.088	7.535	7.555	0.505	0.531	-0.583	1.036
VIDUR	28.968	28.902	28.671	28.463	11.963	11.883	12.044	0.342	-0.285	1.709	0.769
XDH	25.280	25.191	25.191	25.191	2.211	2.211	2.211	0.211	0.211	0.211	0.211
ZFP36	24.559	24.341	24.495	24.545	14.122	16.539	16.547	-0.512	0.477	0.545	0.554
ZMK3	24.841	24.761	23.249	23.598	7.846	7.265	7.482	-0.384	1.314	-0.730	1.593
ZNF281	22.174	23.249	23.597	23.695	5.499	6.030	6.510	0.531	0.692	0.547	0.653
ACTB	15.998	14.952	16.093	14.957	-1.967	-2.307	-4.554	-3.159			
SLC6A	17.695	17.218	17.662	17.464	0.060	0.600	0.600	0.090			
6AP01	15.280	16.149	16.519	16.247	-1.325	-1.370	-1.368	-0.493			
HPRT1	23.452	21.828	22.135	22.813	4.417	4.603	4.488	0.667			
RH1PQ	24.451	24.560	24.561	24.497	14.197	15.511	15.544	-2.069	2.655	-2.949	
HDAC	22.091	22.091	22.091	22.091	2.211	2.211	2.211	0.211	0.211	0.211	0.211
RTC	23.683	23.953	23.346	22.808	5.035	5.168	5.035	0.435	5.105	4.862	
RTC	22.195	21.961	22.157	21.693	5.190	4.734	4.742	0.480	4.837	4.837	
PPC	18.397	18.286	19.442	18.574	1.439	1.392	1.449	0.485	1.435	1.293	
PPC	18.426	18.359	18.320	18.347	1.421	1.411	1.411	0.483	1.293	1.293	
PPC	18.201	17.672	18.322	18.372	1.256	0.453	0.245	1.222			

[0207]

[4b]

DOHH2 세포주에 대한 RT2 글루코코르티코이드 신호전달 PCR 어레이 분석으로부터 구하여진 배수 변환 및 Ct값

유전자	Ct값		ACT (828)				Ctd44				pred		초정	
	DMSO	ConA	Prod	조합	DMSO	Prod	조합	ACT	배수변화	ACT	배수변화	ACT	배수변화	초정
ANP851	34.816	31.431	33.566	30.885	12.869	12.855	14.676	12.638	0.036	6.989	1.067	6.276	-0.771	1.705
ANP43	24.638	23.838	23.992	23.224	5.675	5.312	5.163	5.073	-0.363	1.286	-0.587	1.481	-0.692	1.538
AK2	20.333	20.173	20.262	19.951	3.325	3.197	3.173	3.10	0.272	0.838	0.053	0.964	0.485	0.734
ANP03	26.401	26.186	27.535	26.852	7.392	7.570	8.651	8.704	0.178	0.824	1.259	0.418	1.309	0.404
ANP014	31.134	30.830	31.538	30.854	12.225	12.284	12.654	12.703	0.119	0.921	0.529	0.693	0.578	0.670
ANP44	24.317	24.273	24.937	24.368	5.457	6.113	6.117	6.114	1.065	0.305	0.393	0.339	0.307	0.307
ANP1	즉 정안됨	즉 정안됨	즉 정안됨	즉 정안됨	#21	#21	#21	#21	#21	#21	#21	#21	#21	#21
ARD58	23.881	23.782	23.885	23.886	4.872	5.306	5.301	5.735	0.334	0.793	0.129	0.914	0.883	0.550
ASPH	22.576	22.823	22.369	22.996	3.961	4.487	4.485	4.286	0.826	0.524	0.695	0.884	0.542	
ATF4	19.156	19.190	19.314	18.983	0.147	0.614	0.429	0.832	0.467	0.723	0.282	0.822	0.685	0.622
BLU6	21.529	21.323	21.801	21.773	5.520	2.747	2.917	3.242	0.227	0.834	0.397	0.759	1.102	0.466
BNP8R	30.032	30.932	30.378	30.666	19.938	20.538	20.594	21.505	1.486	0.377	0.362	0.362	2.477	0.180
CAUR	즉 정안됨	즉 정안됨	즉 정안됨	즉 정안됨	#21	15.054	#21	#21	#21	#21	#21	#21	#21	#21
CEPFA	30.676	30.676	32.188	30.646	15.645	12.100	13.304	12.495	-3.345	11.672	-2.341	5.067	3.150	3.277
CEBPB	23.911	23.925	24.317	24.001	4.902	5.349	5.433	5.850	0.447	0.724	0.531	0.692	0.948	0.518
CD442	35.314	34.119	38.933	34.143	13.305	15.533	20.009	15.992	2.238	6.212	5.804	0.095	2.687	0.555
CBP81	22.936	22.746	22.890	22.730	3.922	4.170	4.306	4.579	0.249	0.941	0.095	0.943	0.638	0.534
CBF83	28.929	24.840	24.865	24.667	5.920	6.264	5.981	6.496	0.344	0.788	0.664	0.959	0.576	0.671
CBEB314	24.405	24.110	24.616	24.373	5.396	5.334	5.732	6.222	0.138	0.969	0.336	0.792	0.826	0.664
CTGF	33.711	32.760	33.728	33.696	14.702	14.188	14.844	15.585	0.518	1.472	0.142	0.906	0.843	0.557
CYBB53	37.796	34.945	39.582	34.332	18.984	19.389	20.698	16.188	-5.112	34.577	0.917	0.265	-2.601	0.667
DNMT4	23.934	23.568	24.135	22.346	4.975	4.332	5.223	4.797	0.697	0.935	0.295	0.815	-0.138	1.693
DRAS2	즉 정안됨	즉 정안됨	즉 정안됨	즉 정안됨	#21	#21	#21	#21	#21	#21	#21	#21	#21	#21
DUSP1	27.604	27.132	27.865	27.252	8.595	8.956	8.982	9.111	-0.639	1.037	0.387	0.765	0.516	0.599
EPN3	31.233	32.260	32.263	31.224	12.224	13.684	13.379	13.073	1.460	0.363	1.155	0.449	0.849	0.555
ERD3	32.315	28.852	31.098	23.564	13.306	10.276	12.214	10.523	-3.630	8.168	-1.082	2.132	-2.783	6.883
EREP14	32.525	30.153	32.635	29.938	13.146	11.587	13.751	11.437	-1.629	3.268	0.235	0.855	-2.079	4.225
FRB85	21.986	21.530	20.912	26.512	2.976	2.864	2.038	2.361	-0.332	1.032	-0.948	1.928	-0.615	1.532
FOX12	34.267	29.872	31.543	29.325	12.258	11.285	12.659	11.774	-1.452	2.755	-0.639	1.071	-0.984	1.978
GDPG1	27.532	27.884	27.396	27.882	8.523	8.394	9.000	9.245	0.474	0.721	0.477	0.738	0.722	0.806
GHHR	37.684	39.644	36.095	37.843	18.675	21.088	17.211	23.933	0.186	-1.464	2.753	0.987	0.905	
GU1	36.133	36.671	34.574	36.695	17.124	18.055	15.650	17.948	0.971	0.586	-1.454	2.702	0.824	0.565
GOT1	35.927	33.126	23.532	22.880	4.416	4.550	4.648	4.729	0.132	0.913	0.230	0.853	0.311	0.896

[0208]

8690	24.317	24.377	24.369	24.453	5.708	5.301	6.085	6.302	6.093	6.938	6.377	6.770	6.594	6.663
MAS2	총 정안율	총 정안율	총 정안율	총 정안율	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211
MNRP11	30.324	29.151	33.234	31.380	11.315	10.575	16.800	13.229	-0.1740	1.670	3.0285	0.118	1.914	0.285
IL10	총 정안율	총 정안율	총 정안율	총 정안율	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211
IL184	총 정안율	총 정안율	총 정안율	총 정안율	#211	13.695	14.676	13.415	#211	#211	#211	#211	#211	#211
IL6	총 정안율	총 정안율	총 정안율	총 정안율	#211	34.758	37.658	45.874	#211	#211	#211	#211	#211	#211
IL8	총 정안율	총 정안율	총 정안율	총 정안율	#211	31.365	32.365	#211	13.356	#211	14.232	#211	#211	#211
IL123	22.951	22.420	22.546	21.765	3.942	3.944	3.662	3.614	-0.0398	1.010	-0.285	1.214	-0.328	1.255
ILF9	28.591	28.439	28.547	27.741	9.682	9.683	9.683	9.590	0.181	0.832	-0.019	0.103	-0.092	0.106
IL9	33.562	32.997	34.158	32.855	14.553	14.421	15.274	14.704	-0.132	0.721	0.086	0.151	0.151	0.101
MERK	33.937	32.556	32.892	31.374	13.286	13.892	14.098	13.313	0.1038	1.078	0.029	0.986	0.985	1.396
M116	39.692	39.692	39.692	39.692	20.683	20.683	20.683	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211
M12A	39.546	39.546	39.546	39.546	20.637	20.637	20.637	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211
NFBIA	22.891	22.625	22.839	22.525	3.882	4.048	3.946	4.474	0.1617	0.891	0.064	0.957	0.592	0.663
NR3C1	22.662	22.430	22.794	22.573	3.593	3.834	3.910	4.422	0.261	0.835	0.317	0.803	0.829	0.653
PBD7	23.656	23.417	23.562	23.597	4.647	4.841	4.668	5.246	0.194	0.874	0.021	0.986	0.593	0.660
P06118	35.193	34.934	31.185	31.185	#211	16.647	15.050	15.403	#211	#211	#211	#211	#211	#211
PDP1	25.863	25.725	25.682	25.330	6.854	6.689	6.788	7.179	0.155	1.183	-0.056	1.043	0.375	0.798
PER1	24.944	24.717	25.142	25.289	5.935	6.481	6.258	7.138	0.206	0.887	0.333	0.793	1.203	0.434
PER2	24.642	24.159	23.476	23.633	5.259	5.275	5.225	6.374	-0.126	1.282	-0.358	1.238	-0.308	1.238
PIK3R1	24.177	23.712	23.260	23.650	5.168	5.136	4.966	5.059	-0.032	1.022	-0.202	1.150	0.291	0.817
PLD1	37.038	37.038	37.120	36.323	#211	18.326	20.112	#211	#211	#211	0.267	0.865	2.145	0.226
PLX4451	29.896	29.414	28.946	28.414	10.376	10.536	10.587	10.527	0.1821	-0.347	1.272	-0.290	1.223	1.223
PRK2E1	24.378	24.003	24.635	23.667	5.368	5.827	5.768	5.516	0.058	0.961	0.385	0.760	0.142	0.393
PRK2E2	22.469	22.467	22.489	21.930	3.460	3.591	3.695	3.779	0.131	0.913	0.245	0.904	0.319	0.862
RAS23	27.152	27.636	27.803	26.392	8.143	9.050	8.919	10.241	0.917	0.530	0.776	0.584	2.098	0.234
RS52	24.730	24.863	25.514	25.639	5.781	6.285	6.639	7.088	0.504	0.785	0.849	0.555	1.707	0.306
RHO6	32.661	30.745	33.162	30.702	13.552	12.169	14.278	12.551	-1.483	2.795	0.636	0.643	-1.101	2.145
RHOJ	총 정안율	총 정안율	총 정안율	총 정안율	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211
SEEN1	24.226	23.668	22.839	21.993	5.217	5.272	3.955	3.842	0.055	0.963	-1.262	2.393	-1.375	2.554
SGK3	27.633	27.823	29.623	29.125	3.624	9.245	10.744	10.974	0.621	0.630	2.130	0.239	2.350	0.436
SLC10A6	34.483	36.435	36.196	32.736	15.374	17.859	17.292	14.587	2.385	0.193	1.818	0.284	-0.887	1.389
SLC19A2	25.630	24.859	25.455	24.769	6.591	6.283	6.571	6.518	-0.308	1.238	-0.020	1.014	0.391	0.391
SLC22A5	26.392	27.992	27.935	27.535	9.383	9.416	10.031	9.684	0.633	0.977	0.648	0.633	0.301	0.812
SN17A1	24.584	24.550	25.124	25.650	5.575	5.374	6.245	6.848	0.393	0.758	0.665	0.631	1.274	0.414
SPN2	30.677	28.863	29.971	28.846	11.668	10.289	11.087	10.495	-1.331	2.604	-0.581	1.495	-1.373	2.255
SPN3	27.110	26.652	26.931	26.623	8.101	8.076	8.077	8.470	-0.025	1.017	-0.074	1.053	0.369	0.774

STAT5A	24.237	23.771	23.885	23.477	5.228	5.195	5.061	5.326	-0.033	1.023	-0.227	1.170	0.098	0.938
STAT5B	22.593	22.328	22.632	22.414	3.494	3.752	3.748	4.263	0.253	0.836	0.254	0.839	0.769	0.537
TBL1XK1	21.397	20.994	21.304	21.133	2.388	2.418	2.420	2.582	0.930	0.979	0.632	0.976	0.594	0.663
TNF	31.318	31.649	31.96	31.194	12.319	13.273	13.072	13.043	0.654	0.516	0.753	0.593	0.724	0.605
TNFAIP3	28.269	27.720	27.586	27.191	8.951	8.944	#211	12.435	-0.387	1.237	#211	3.184	6.110	
T5C22D3	25.175	24.752	25.310	22.374	6.157	6.176	4.426	4.223	0.609	0.954	-1.743	3.343	-1.344	3.848
USP2	24.104	23.884	23.591	22.971	5.095	5.108	4.617	4.820	0.013	0.981	-0.478	1.393	-0.275	1.210
USP54	26.599	25.892	26.683	25.856	7.539	7.316	7.793	7.205	-0.274	1.209	0.269	0.865	0.115	0.923
VER	27.405	26.426	26.837	26.577	8.357	7.859	7.963	8.246	-0.547	1.464	-0.436	1.352	0.629	0.980
VIDER	27.155	27.332	28.554	27.543	8.157	8.356	9.766	9.592	0.493	0.768	1.543	0.343	1.235	0.435
XDH	24.170	23.860	24.270	24.094	5.161	5.404	5.386	5.943	0.243	0.845	#211	#211	#211	#211
ZFP36	25.303	24.651	24.458	23.897	6.191	6.035	5.534	5.746	-0.156	1.114	-0.657	1.577	-0.445	1.384
ZHX2	24.065	23.941	23.838	23.343	5.037	4.965	4.944	5.192	-0.092	1.066	-0.113	1.081	0.135	0.911
ACTB	14.843	14.319	14.721	14.809	4.166	4.057	4.163	3.642						
81286	19.698	18.376	18.284	18.154	0.966	0.980	0.966	0.966	0.006	0.006				
GAPDH	36.513	36.137	36.511	36.157	-2.496	-2.379	-2.333	-1.898						
HPRT1	21.698	21.561	21.777	21.657	2.689	2.985	2.893	3.506						
RPLP0	15.187	14.335	15.158	14.595	-3.822	-3.641	-3.756	-3.556						
HGEUC	21.234	21.245	21.469	21.683	2.275	2.275	2.768	2.565	3.332					
RTG	21.287	21.310	21.444	21.371	2.278	2.834	2.580	3.220						
RTG	21.358	21.384	21.483	21.483	2.343	2.638	2.593	3.332						
PPC	18.611	18.672	18.664	18.624	-0.393	0.096	-0.230	0.373						
PPC	18.638	19.142	18.689	18.587	-0.371	0.566	-0.185	0.136						
PPC	18.545	18.711	19.076	18.685	-0.363	0.135	0.132	0.554						

[0211]

WSU 세포주에 대한 RT2 글루코로티코이드 신호전달 PCR 어레이 분석으로부터 구하여진 폐수 변화 및 Ct값

[표 4c]

유전자	DNASeq	Seq44	Pred	조합	ACT(B2M)			조합	ACT	폐수변화	Pred	폐수변화	ACT	폐수변화
					MSQ	Std44	Std44							
ADRB81	26.315	25.386	26.103	26.038	6.8866	5.761	6.963	5.835	5.165	2.242	0.097	0.935	-1.021	2.039
AF1	28.163	27.915	27.334	26.727	8.653	8.249	8.185	6.554	-6.413	1.331	-0.464	1.379	-2.039	4.284
AK2	20.644	21.365	20.633	22.068	1.194	1.686	1.288	3.586	0.714	0.696	0.937	0.762	0.615	
AMPN3	28.467	27.482	27.943	26.847	9.617	7.477	8.798	6.674	-1.546	2.968	-0.219	1.164	-2.343	5.374
AMPN4	31.844	30.487	30.810	31.510	11.894	10.802	11.665	11.337	-1.392	2.285	-0.329	1.256	-0.657	1.577
ANXA4	27.736	28.639	25.496	25.013	8.286	4.974	8.263	4.840	-3.312	9.934	-0.025	1.617	-3.446	10.898
ANXA4	32.605	33.595	32.756	32.711	13.960	14.450	12.813	12.811	12.811	12.811	12.811	12.811	12.811	12.811
ARID5B	26.264	26.116	26.722	27.146	6.794	6.464	7.576	6.987	-0.353	1.277	0.942	0.582	0.175	0.867
ASPH	22.285	22.415	21.939	22.834	2.835	2.730	2.794	2.661	-0.125	1.075	-0.044	1.023	-0.174	1.128
ATP4	19.874	20.470	19.659	20.871	0.564	0.785	0.514	0.698	0.361	0.779	0.030	0.940	0.274	0.827
BTG16	26.954	20.795	26.893	21.133	1.504	3.110	1.753	0.966	-0.334	1.314	0.249	0.841	-0.544	1.453
BNIP9	36.814	36.814	36.814	36.814	38.494	40.364	37.211	37.211	37.211	37.211	37.211	37.211	37.211	37.211
CA12	28.338	27.614	27.838	27.667	9.988	7.339	8.693	7.474	1.455	3.158	-0.295	1.227	-1.114	2.836
CEBPB	25.266	26.770	25.775	27.127	5.836	7.085	6.630	7.614	1.269	0.615	0.814	0.569	1.198	0.436
COXA2	23.376	23.413	23.732	23.778	3.528	2.211	1.518	1.583	1.211	1.211	1.211	1.211	1.211	1.211
CREB3	25.359	25.459	25.551	25.353	5.559	5.774	5.406	5.220	1.220	1.061	-0.453	1.369	-0.115	1.357
CREB3L4	26.072	24.392	24.437	24.348	8.622	6.707	5.292	4.711	-0.915	1.836	-0.330	1.257	-1.451	2.734
CTGF	26.391	26.391	26.391	26.391	3.528	2.211	1.518	1.583	1.211	1.211	1.211	1.211	1.211	1.211
CYB561	36.874	33.478	32.971	33.798	17.224	13.733	13.626	13.626	-5.631	49.556	-3.598	12.109	-3.798	13.918
DEHA4	24.229	24.404	22.252	22.739	4.779	4.719	3.107	2.586	-0.080	1.042	-1.672	3.187	-2.213	4.638
DEHA52	24.873	24.873	24.873	24.873	3.285	2.211	1.211	1.211	1.211	1.211	1.211	1.211	1.211	1.211
DUSP1	24.873	23.284	25.352	26.352	6.729	7.589	6.633	6.319	1.373	0.587	0.656	0.730	0.150	0.901
EMBN1	26.349	30.819	26.487	26.211	6.664	11.674	6.234	6.234	1.211	1.211	1.211	1.211	1.211	1.211
END3	29.674	24.270	27.724	24.466	10.224	4.585	3.579	3.693	-5.639	49.832	-1.645	3.127	-6.331	75.133
ERBB1	32.771	32.771	32.771	32.771	32.885	2.211	13.086	2.211	12.723	2.211	1.211	1.211	1.211	1.211
ERBB5	22.873	23.267	21.321	21.824	5.423	3.582	2.176	1.651	0.159	0.896	-1.287	2.373	-1.773	3.415
ERBB5L2	34.163	34.163	34.163	34.163	14.653	14.455	14.592	14.517	3.148	2.813	0.139	2.656	0.138	
ERBB7	28.372	27.484	28.235	27.363	9.931	7.869	9.986	7.136	-1.112	2.161	0.169	0.889	-1.791	5.461
ERBB8	34.536	39.957	37.789	37.789	15.126	20.272	18.644	21.211	5.086	0.029	3.438	0.093	0.211	0.211
G0L1	28.395	31.675	30.693	30.693	2.710	12.330	10.418	1.211	1.211	1.211	1.211	1.211	1.211	1.211
G0L1	22.894	23.827	22.841	24.434	4.142	3.695	4.238	4.798	0.612	0.262	0.834	0.834	0.573	

[0212]

86PD	26.369	25.976	26.197	25.435	6.910	6.291	7.052	5.262	-0.639	1.536	0.142	0.906	-1.648	3.134
HAS2	즉 정안법	즉 정안법	즉 정안법	즉 정안법	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211
NNSP1	23.972	24.176	24.750	26.864	4.522	4.485	5.685	6.693	-0.637	1.626	1.083	0.472	2.169	0.222
IL0	즉 정안법	34.229	34.366	35.110	#211	14.544	15.161	14.837	#211	#211	#211	#211	#211	#211
IL1N	32.606	28.388	33.599	29.393	13.356	8.703	24.454	9.220	-4.553	24.902	1.298	0.407	-3.536	15.305
IL6	즉 정안법	즉 정안법	즉 정안법	즉 정안법	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211
IL6R	즉 정안법	33.814	23.814	23.671	5.039	4.115	4.637	3.498	-0.674	1.364	-0.462	1.338	-1.591	3.013
IL1F13	24.539	23.860	23.792	28.187	11.391	9.196	10.360	8.914	-2.195	4.579	-0.431	1.348	-3.377	16.359
IL1F9	30.841	28.881	30.105	34.511	34.399	34.511	34.714	15.365	-0.102	1.073	0.556	0.633	-0.732	1.720
ILX	24.206	24.399	34.511	34.399	14.616	14.616	14.616	14.616	-0.211	#211	#211	#211	#211	#211
N6F1K	즉 정안법	31.323	31.524	28.211	11.638	12.379	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211
N611E	즉 정안법	즉 정안법	즉 정안법	즉 정안법	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211
N612A	24.717	23.925	24.518	24.350	5.267	3.814	5.373	4.277	-1.453	2.738	0.936	0.929	-1.096	2.129
N6F1B1A	22.371	23.807	22.835	23.454	2.921	4.122	3.790	3.281	1.201	0.435	0.829	0.563	0.360	0.779
NR4C1	23.289	23.021	23.140	23.380	3.436	3.965	3.177	0.364	1.287	0.165	0.892	-0.673	1.694	
PCDDY	24.179	24.746	23.874	25.246	4.729	5.055	4.729	5.055	0.326	0.798	0.936	1.000	0.346	0.267
PGGFB5	즉 정안법	즉 정안법	즉 정안법	즉 정안법	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211
PPD1	25.371	25.726	24.937	25.536	5.921	5.543	5.812	5.363	-0.280	1.301	-0.409	1.078	-0.553	1.672
PER1	25.109	25.320	24.939	26.651	6.135	5.844	6.378	6.476	0.719	0.185	0.883	0.819	0.567	
PER2	24.451	24.837	24.238	25.563	5.001	5.152	5.073	5.390	0.151	0.904	0.072	0.951	0.369	0.764
PK381	23.734	24.332	23.459	24.680	4.284	4.647	4.284	3.607	0.363	0.778	0.063	1.000	-0.377	1.359
PLD1	즉 정안법	즉 정안법	35.266	즉 정안법	#211	16.121	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211
PLRNH1	27.205	28.650	26.977	29.585	7.755	8.975	7.832	9.412	1.200	0.439	0.817	0.945	1.657	0.317
PG12E1	24.234	24.671	24.368	24.732	4.724	4.986	5.223	4.559	0.202	0.369	0.439	0.738	-0.225	1.169
PGH2E2	23.123	22.678	22.565	22.920	3.673	2.993	3.420	2.747	-0.680	1.682	-0.253	1.192	-0.926	1.960
RAS2A3	23.952	23.238	23.454	23.293	4.502	3.523	4.309	3.120	-6.579	1.971	-0.153	1.143	-1.382	2.686
RG552	22.932	24.053	23.932	27.592	3.452	5.184	4.817	7.129	1.732	0.301	1.365	0.386	3.677	0.4578
RHO8	23.724	27.334	28.893	27.392	10.274	7.549	9.658	7.219	2.725	6.632	-0.516	2.533	3.055	2.311
RHO1	즉 정안법	즉 정안법	즉 정안법	즉 정안법	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211
SE5N1	28.689	25.215	25.915	21.378	9.238	5.530	6.770	1.205	-3.709	13.977	-2.468	5.537	8.034	262.305
SE5K1	25.579	28.524	30.174	6.129	8.939	8.164	10.601	2.810	0.143	2.035	0.244	3.872	0.668	
SLC10A6	36.617	35.884	37.200	39.553	17.467	15.989	18.055	19.889	-1.163	2.247	0.888	0.540	2.313	0.261
SLC10A2	26.538	26.115	25.887	26.491	7.188	6.449	6.741	5.928	-0.746	1.679	-0.446	1.562	-1.260	2.395
SLC24A5	28.503	26.646	29.432	27.888	9.451	6.555	10.282	7.315	-2.496	5.561	0.631	0.562	-2.136	4.995
SNP1	24.438	24.431	24.329	25.186	4.986	4.496	5.184	4.993	-0.922	1.486	0.496	0.873	0.395	0.997
SNPK3	29.643	29.333	29.834	29.702	10.193	9.646	10.659	9.579	-0.545	1.459	0.466	0.724	-0.664	1.934
SP581	29.613	26.852	29.563	27.294	10.353	7.267	10.818	7.121	-2.896	7.444	0.655	0.635	-0.042	8.236

STATSA	25.567	25.495	25.699	24.956	5.117	5.810	6.554	4.783	-0.397	1.237	6.437	6.733	-4.334	2.511	
STATSB	23.414	23.453	23.270	23.385	3.964	3.768	4.125	3.812	-0.496	4.146	0.164	0.294	-0.152	1.131	
781XK1	21.602	22.111	21.479	22.588	2.152	2.426	2.334	2.415	0.274	0.827	0.182	0.881	0.263	0.833	
78F	23.698	25.019	24.151	25.675	4.244	5.594	5.085	5.862	1.150	0.451	0.762	0.590	1.258	0.448	
W64B23	24.946	26.903	26.733	28.675	5.496	7.218	7.588	8.362	1.722	6.393	2.052	6.235	3.306	0.124	
YSC21D5	25.514	25.393	22.481	21.879	6.064	5.705	3.356	3.566	-0.389	1.283	-2.728	6.635	-4.558	23.555	
HSF2	22.646	21.983	20.886	20.540	3.196	2.118	1.759	0.467	-0.378	1.976	-1.457	2.745	-2.729	6.630	
W5P54	26.548	26.807	26.453	27.306	7.039	7.122	7.308	7.135	0.023	0.984	0.209	0.865	0.034	0.977	
VDR	30.102	27.233	27.332	29.319	19.652	7.608	16.087	7.146	-3.044	6.248	-0.565	1.473	-3.506	11.361	
YD1R	28.252	32.346	35.596	36.101	8.392	12.663	11.451	1.21	3.553	0.569	2.649	6.153	#21	#21	
XCH	총 91회	총 91회	총 91회	총 91회	#21	#21	#21	#21	#21	#21	#21	#21	#21	#21	#21
ZP936	24.367	25.541	25.156	26.450	4.917	5.556	6.021	6.277	0.933	0.512	1.104	0.865	1.360	0.396	
ZBX3	25.774	24.831	25.570	25.485	6.324	5.446	6.425	5.312	-1.176	2.253	0.131	0.932	-1.612	2.017	
ZNF281	24.037	23.913	23.688	24.177	4.557	4.228	4.463	4.464	-0.229	1.256	-0.094	1.067	-0.153	1.112	
ACT8	14.801	15.450	14.572	16.143	-4.649	-4.235	-4.573	-4.036							
82%	19.430	18.683	19.133	20.773	0.630	0.680	0.600	0.600							
GAD98	16.536	17.275	16.349	17.116	-2.922	-2.410	-2.795	-2.797							
HPT1L	21.569	22.793	21.361	23.232	2.659	3.108	2.235	3.559							
KRPG	15.697	15.681	15.330	15.448	-3.753	-4.004	-3.815	-4.824							
NGDC	총 91회	총 91회	총 91회	총 91회	#21	#21	#21	#21							
RTC	21.199	20.891	21.392	21.368	1.749	1.206	2.247	1.395							
RTC	21.213	20.949	21.293	21.125	1.769	1.264	2.148	1.252							
RTC	21.216	20.945	22.237	21.520	1.766	1.260	2.092	1.247							
RPC	18.986	18.798	18.835	18.992	0.466	0.887	-0.318	-1.321							
RPC	18.832	18.877	18.870	18.841	-0.618	-0.638	-0.275	-1.332							
RPC	18.869	19.037	18.835	18.873	-0.581	-0.678	-0.272	-1.338							

[0215]

[4d]

SUDHL10 세포주에 대한 RT2 글루코코르티코이드 실험일 PCR 이례이 분석으로부터 구하여진 배수 변화 및 Ct값

유전자	Ct값		ACT(B2M)				Cp044				Pred		조합	조합	ACT	배수변화	ACT	배수변화
	DiffSQ	Std44	Pred	조합	DiffSQ	Std44	Pred	조합	DiffSQ	Std44	Pred	조합						
ANRBR31	35.424	31.215	31.883	32.346	11.895	12.888	14.229	14.612	0.073	0.951	2.334	2.013	2.017	0.247				
ANPFI1	28.476	29.849	27.606	27.812	10.052	10.702	9.946	9.978	0.650	0.637	-0.196	1.076	-1.074	2.105				
ANP2	20.354	20.974	19.257	19.672	1.928	1.827	1.583	1.838	-0.101	1.973	-0.345	1.270	-0.270	1.064				
ANP03	27.489	27.658	26.563	27.563	9.063	8.507	8.786	8.729	-0.556	1.420	-0.327	1.258	-0.344	1.261				
ANCP014	30.772	32.191	31.442	31.246	12.345	12.950	12.246	12.372	0.615	0.553	-0.195	1.075	-0.233	0.851				
ANX04	26.715	24.361	25.982	24.755	8.288	5.814	5.288	5.921	-2.475	5.580	-0.091	1.991	-2.358	5.162				
AP031	26.314	26.314	26.314	26.314	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	
AR038	26.837	28.338	27.668	27.409	8.411	9.061	10.014	8.575	0.650	0.537	1.003	0.329	0.364	0.893				
AS094	25.820	24.837	22.217	24.222	4.394	4.680	4.563	5.488	0.296	0.815	0.669	0.889	1.094	0.468				
ATP4	18.149	20.507	18.947	20.228	-0.277	1.460	1.263	1.365	1.737	0.360	1.870	0.337	1.872	0.273				
BT16	21.276	22.639	21.575	23.181	2.852	3.492	3.319	4.347	0.640	0.642	1.067	0.477	1.485	0.355				
CEP038	26.205	26.384	26.324	26.552	4.539	5.352	4.458	5.427	0.313	0.423	0.427	0.427	0.427	0.427	#211	#211	#211	
CEP038	26.384	26.324	26.324	26.324	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	
CALCE	26.214	26.214	26.214	26.214	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	
CEP03A	23.894	23.894	22.395	22.395	10.779	9.753	11.563	9.538	1.026	2.036	0.784	0.584	-1.204	2.364				
CEP03B	22.884	22.884	22.884	22.884	25.217	25.372	25.217	25.372	6.385	5.818	5.913	6.423	2.427	3.360	0.195			
CNA4A2	26.214	26.214	26.214	26.214	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	
CRE01	23.139	23.839	22.395	22.395	4.713	4.662	4.741	4.864	0.951	1.036	0.628	0.981	0.991	0.939				
CRE03	25.310	26.452	24.446	25.358	6.884	7.305	6.786	6.564	0.421	0.747	0.698	1.070	-0.330	1.248				
CREB014	24.612	26.139	24.960	26.248	6.185	6.992	7.306	7.444	0.306	0.572	1.120	0.460	1.228	0.427				
CG04F	26.214	26.214	26.214	26.214	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	
CY05561	38.682	37.694	38.674	38.655	20.755	17.837	19.351	20.470	-2.399	5.274	0.164	0.883	-0.925	1.899				
DE014	23.944	26.109	21.960	21.758	5.518	6.962	4.306	2.925	1.444	0.368	-1.212	2.317	-2.533	6.034				
DR0A52	26.214	26.214	26.214	26.214	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	
DR0P14	28.480	31.300	27.939	28.395	14.054	12.133	10.335	9.551	1.098	0.467	-0.719	1.686	-1.503	2.34				
ER0B1	26.214	26.214	26.214	26.214	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	
ER0B3	26.932	26.768	25.895	25.893	8.506	7.623	8.234	6.969	0.885	1.387	-0.272	1.267	-1.537	2.902				
ER0B1	26.214	26.214	26.214	26.214	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	
FR0B5	22.120	22.383	19.749	20.375	3.694	3.736	2.0395	1.841	0.042	0.971	-1.039	3.079	-1.833	3.613				
FQ032	32.273	32.931	29.930	30.249	15.847	13.764	12.335	12.013	-0.063	1.048	-1.511	2.850	-1.832	3.560				
GDPP01	31.621	30.943	29.917	30.021	13.302	11.795	12.263	11.177	-1.405	2.548	-0.338	1.916	-2.024	4.067				
GH0808	33.946	33.946	36.757	36.757	19.103	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	
GU01	23.510	25.306	23.519	24.803	5.084	6.159	5.865	5.969	1.075	0.475	0.981	0.582	0.385	0.541				

[0216]

HRD2	25.134	28.126	36.256	26.915	7.753	8.573	8.592	8.084	1.224	6.439	0.344	0.557	0.323	0.799
HA52	총정안됨	총정안됨	총정안됨	총정안됨	#21	#21	#21	#21	#21	#21	#21	#21	#21	#21
HRP04	22.972	23.768	22.692	24.046	4.546	4.617	5.038	5.332	0.971	0.952	0.432	0.711	0.636	0.643
H10	총정안됨	총정안됨	총정안됨	총정안됨	#21	13.338	#21	14.684	#21	#21	#21	#21	#21	#21
H12N	총정안됨	총정안됨	총정안됨	총정안됨	#21	13.635	#21	#21	#21	#21	#21	#21	#21	#21
H5	총정안됨	총정안됨	총정안됨	총정안됨	#21	#21	#21	#21	#21	#21	#21	#21	#21	#21
HR8	총정안됨	총정안됨	총정안됨	총정안됨	#21	14.660	16.147	#21	#21	#21	#21	#21	#21	#21
KLF13	25.481	24.536	22.488	23.832	7.025	5.368	4.834	3.998	-3.636	3.158	-2.431	4.565	-3.027	8.551
KLF9	32.631	32.525	30.255	29.691	14.505	13.378	12.601	10.837	-1.127	2.184	-1.934	3.742	-3.648	12.536
LDX	33.568	35.385	32.223	32.465	15.674	15.238	14.569	13.633	1.164	0.466	-0.505	1.413	-1.443	2.719
MEH1K	총정안됨	총정안됨	총정안됨	총정안됨	#21	15.505	#21	14.152	#21	#21	#21	#21	#21	#21
MT1E	총정안됨	총정안됨	총정안됨	총정안됨	#21	34.503	#21	15.659	#21	#21	#21	#21	#21	#21
MT2A	34.844	37.725	35.909	35.845	15.418	18.078	18.255	17.015	1.660	0.316	1.837	0.280	0.597	0.661
MRK18A	22.331	23.754	21.628	22.744	3.905	4.507	3.924	3.910	0.602	0.539	0.669	0.953	0.005	0.957
MR3C1	22.516	23.764	22.090	22.835	4.090	4.617	4.346	4.003	0.527	0.684	0.256	0.837	-0.089	1.064
PGCD7	23.639	25.123	23.256	24.731	5.174	5.376	5.602	5.857	0.802	0.574	0.428	0.743	0.723	0.706
PGDF54B	총정안됨	총정안됨	총정안됨	총정안됨	#21	#21	#21	#21	#21	#21	#21	#21	#21	#21
PGF1	25.438	26.175	25.128	26.355	7.012	7.028	7.524	7.825	0.016	0.989	0.512	0.701	0.413	0.753
PGF1	26.209	27.210	24.782	24.686	7.763	8.563	7.308	7.852	0.780	0.582	-0.575	1.597	0.069	0.853
PER2	23.638	24.780	22.642	24.465	5.492	5.633	4.938	5.633	0.441	0.727	-0.204	1.152	0.439	0.738
PKR83	23.509	24.661	22.697	23.585	5.083	5.518	4.503	4.753	0.431	0.742	-0.040	1.028	-0.332	1.759
PLD1	총정안됨	총정안됨	총정안됨	총정안됨	#21	#21	#21	#21	#21	#21	#21	#21	#21	#21
PLX4443	27.793	26.929	27.331	9.363	9.832	9.697	8.497	0.466	0.722	-0.326	1.254	-0.866	1.823	-
PGU21	25.415	25.642	24.283	24.827	6.629	6.695	6.629	5.923	0.006	0.996	-0.060	1.042	-0.696	1.820
PGU22	23.953	25.098	22.947	24.098	5.527	5.951	5.323	5.264	0.424	0.785	-0.204	1.152	-0.263	1.306
RAA3	23.171	24.277	22.449	23.649	4.745	5.130	4.795	4.815	0.385	0.766	0.050	0.966	0.070	0.953
RG52	24.734	25.387	25.390	26.163	6.368	6.440	7.735	7.327	0.072	0.931	1.368	0.387	0.959	0.334
RHQB	28.533	27.229	27.968	26.383	10.157	9.882	10.314	7.549	-1.475	2.780	0.157	0.897	-2.608	6.057
RHO1	총정안됨	총정안됨	총정안됨	총정안됨	#21	17.383	#21	#21	#21	#21	#21	#21	#21	#21
SE5N1	28.405	27.880	24.220	22.646	9.379	8.333	6.566	3.812	-1.846	3.136	-3.433	16.652	-6.167	71.854
SGK1	22.694	25.058	22.897	24.642	4.268	6.211	5.243	5.808	1.543	0.260	0.975	0.509	1.540	0.344
SLC10A6	36.937	37.060	34.670	36.258	18.561	17.913	17.016	17.434	0.548	1.567	-1.545	2.918	-1.137	2.159
SLC19A2	31.019	30.597	31.354	32.593	11.430	14.285	12.530	11.145	-1.145	2.208	1.693	0.399	1.052	-
SLC22A5	31.275	30.563	32.426	29.324	12.849	11.116	14.372	13.489	-1.733	3.324	1.923	0.264	-2.359	5.330
SNY1	25.751	23.903	24.913	26.574	7.375	7.856	7.350	0.531	0.682	-0.066	1.042	0.215	0.862	-
SPHK1	26.882	27.804	25.803	27.082	8.426	8.657	8.147	8.248	0.234	0.832	-0.279	1.213	-0.178	1.331
SPSB1	25.856	26.333	24.455	24.642	7.439	6.986	6.301	5.808	-0.444	1.369	-0.629	1.546	-1.622	3.076

STAT5A	24.179	25.375	23.779	24.556	5.744	6.128	6.125	5.716	6.384	6.766	6.391	6.768	-0.018	1.028
STAT5B	23.533	24.381	23.480	24.334	5.107	5.134	5.826	5.597	0.027	0.991	0.739	0.608	0.290	0.118
YBL048C	20.891	21.546	20.224	21.815	2.465	2.699	2.570	2.581	0.234	0.850	0.165	0.930	0.516	0.699
YHR	23.208	23.725	22.657	24.669	4.782	4.578	5.063	5.835	-0.204	1.152	0.221	0.858	1.053	0.682
YWF419J	26.832	27.527	27.010	26.248	9.406	9.330	9.356	7.915	0.124	0.918	0.950	0.518	-0.393	1.405
Y5C2233	25.641	26.371	23.180	22.806	7.015	9.724	5.506	3.575	2.768	6.153	-1.569	2.846	-3.043	8.225
Y5P2	22.643	23.634	21.579	22.560	4.217	4.287	3.925	3.926	0.670	0.953	-0.292	1.224	-0.691	1.614
Y5P54	27.132	27.789	26.404	27.779	8.706	8.642	8.747	8.545	-0.064	1.045	0.041	0.972	-0.161	1.138
YDR	29.507	29.514	28.490	28.525	11.083	10.387	10.836	9.691	-0.714	1.646	-0.245	1.185	-1.380	2.621
YEL01R	27.937	32.964	31.762	32.693	9.511	13.787	14.108	13.259	4.245	0.653	4.597	0.041	3.748	0.074
YDR	총 정안법	총 정안법	총 정안법	총 정안법	#21	#21	#21	#21	#21	#21	#21	#21	#21	#21
ZFP36	25.707	26.663	24.515	25.387	7.381	7.896	7.955	7.955	0.215	0.861	-0.420	1.338	-0.228	1.113
ZBX3	26.753	26.325	26.098	26.293	8.327	7.458	8.358	7.559	-1.169	2.249	0.927	0.981	-0.768	1.793
ZNF281	23.573	23.857	22.336	23.665	5.147	6.710	4.682	4.833	-0.437	1.384	-0.465	1.380	-0.316	1.245
ACT8	14.330	14.822	13.138	14.548	-4.096	-4.319	-4.516	-4.386						
82368	4.8.426	4.8.427	4.7.656	4.8.634	0.093	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
GADPH	16.524	17.793	15.659	16.935	3.982	-1.354	-1.985	-1.599						
HPRT1	19.452	20.615	18.679	20.706	1.026	1.668	1.025	1.872						
RPLP0	15.746	16.821	15.189	15.285	-2.680	-2.326	-2.485	-3.049						
H5DC	총 정안법	총 정안법	총 정안법	총 정안법	#21	#21	#21	#21	#21	#21	#21	#21	#21	#21
RTG	22.619	22.346	22.486	22.181	4.193	4.193	4.193	4.193	4.342	4.342	4.342	4.342		
RTG	22.636	22.362	22.631	23.601	4.250	3.215	4.250	4.250	4.367	4.367	4.367	4.367		
RTG	22.662	22.313	22.424	23.114	4.236	3.166	4.236	4.236	4.380	4.380	4.380	4.380		
PPC	18.253	18.442	17.950	18.476	-0.173	-0.705	0.365	0.358						
PPC	18.527	18.474	18.446	18.484	0.501	-0.673	0.780	-0.388						
PPC	18.416	18.623	18.515	18.482	-0.016	-0.524	0.861	-0.352						

[0219]

[4e]

RI 세포주에 대한 RT2 글루코코르티코이드 신호전달 PCR 어레이 분석으로부터 구하여진 배수 변환 및 Ct값

유전자	Ct값		ΔCt (Δ2M)		Cp444		Pred		조합	
	BM532	C6654	BM532	조합	C6654	Pred	AMT	배수변화	AMT	배수변화
ATMRS1	27.745	26.650	28.623	9.377	9.377	-1.672	0.413	0.751	0.413	0.751
ATF1	28.249	26.820	27.258	7.927	7.927	-2.586	4.917	-1.330	2.621	-1.237
AK2	19.425	20.270	20.510	21.466	0.644	0.912	2.220	0.268	0.630	0.335
ANPBP3	27.469	27.151	27.354	27.238	8.718	8.735	-0.885	1.847	-0.544	1.158
ANGPTL4	36.178	29.830	32.245	29.596	11.397	10.462	13.955	1.912	1.688	1.086
ANXA4	24.380	24.395	24.910	24.771	5.599	5.037	5.525	-0.562	1.476	-0.074
AP2M1	총 정인암	총 정인암	총 정인암	33.328	#211	#211	#211	#211	#211	#211
ARDNS8	27.916	27.393	28.208	28.495	9.195	9.795	10.938	9.249	4.230	0.963
ASPH	22.415	23.465	23.533	24.410	3.632	4.106	4.403	5.154	0.476	1.512
ATF4	17.689	18.269	19.482	20.548	1.982	1.089	0.272	1.394	0.093	1.368
BCU6	29.445	20.289	20.705	20.774	0.626	0.931	1.605	1.526	0.268	0.933
BMSR	총 정인암	총 정인암	총 정인암	총 정인암	#211	#211	#211	#211	#211	#211
CALCR	총 정인암	총 정인암	총 정인암	총 정인암	#211	#211	#211	#211	#211	#211
CEPBA	총 정인암	총 정인암	총 정인암	총 정인암	#211	#211	#211	#211	#211	#211
CEPBS	23.152	23.755	23.223	27.211	4.411	17.53	8.407	7.046	1.003	2.638
CC442	31.978	31.762	35.212	33.197	12.423	#211	15.966	-0.773	1.026	0.147
CNE81	22.435	23.217	23.337	23.479	3.654	3.859	4.337	4.224	0.168	0.573
CREBB3	23.760	24.178	24.851	24.755	5.039	5.826	5.771	5.485	-0.159	1.340
CREBB3A	23.583	23.500	24.211	23.870	4.602	4.182	5.031	4.624	-0.760	1.398
CTG36	총 정인암	총 정인암	총 정인암	총 정인암	#211	#211	#211	#211	#211	#211
CTNS51	39.352	38.452	38.098	37.618	23.371	19.094	18.908	18.372	-2.477	2.734
DNMT4	21.661	22.679	23.471	22.583	7.860	3.321	4.281	3.337	0.461	5.126
DRB2	총 정인암	총 정인암	총 정인암	총 정인암	#211	#211	#211	#211	#211	#211
GU551	25.166	25.442	25.442	24.901	5.385	6.056	5.232	5.735	-0.314	1.449
ESD1	34.815	34.448	32.793	33.665	12.357	20.860	11.854	-1.268	2.310	0.595
ERCB3	24.937	24.572	25.411	23.975	8.175	5.214	6.231	4.725	-0.952	4.348
ERBB1	총 정인암	총 정인암	총 정인암	총 정인암	#211	#211	#211	#211	#211	#211
ERBB5	20.792	21.767	20.858	20.921	2.011	3.955	1.678	1.535	0.388	0.764
FOSL2	31.458	30.761	34.137	36.459	12.677	11.403	14.377	17.113	-1.274	2.318
GDFD1	27.588	27.584	28.639	28.110	8.668	8.036	9.519	8.664	-0.772	1.708
GHSNR	총 정인암	총 정인암	총 정인암	총 정인암	#211	#211	#211	#211	#211	#211
GILR	30.715	28.738	32.131	32.981	11.954	9.360	13.001	13.715	-2.614	1.607
GOT1	21.489	22.554	23.335	24.551	2.708	3.226	4.175	5.305	0.518	5.362
HEPD	25.108	25.042	26.442	24.742	6.327	5.654	7.252	5.495	-0.671	0.935

[0220]

	측정안됨	측정안됨	측정안됨	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211
NA52	22.844	23.146	24.289	3.177	3.486	3.966	5.043	0.369	0.807	0.733
NA53	21.958	22.844	23.669	13.572	12.140	12.486	#211	-1.462	2.898	-0.088
NA54	32.353	31.456	32.669	15.928	15.928	15.126	9.358	-1.882	3.083	1.059
NA55	29.708	28.405	29.300	22.003	9.582	9.582	10.126	3.083	-1.751	-0.973
NA56	측정안됨	측정안됨	측정안됨	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211
NA57	29.184	29.246	30.468	31.321	10.463	9.888	11.288	12.675	-0.515	1.429
NA58	21.884	21.884	23.322	4.352	4.356	4.365	4.376	-0.565	1.680	0.341
NA59	34.469	34.469	34.469	15.688	#211	#211	#211	#211	0.765	0.930
NA60	33.915	33.915	33.948	15.157	14.567	15.026	14.702	-0.560	1.096	1.211
NA61	36.659	36.659	36.659	31.272	15.782	11.333	#211	12.626	-4.419	21.382
NA62	34.215	34.215	34.215	14.857	#211	#211	#211	#211	#211	#211
NA63	23.125	24.275	25.579	4.344	4.921	6.583	6.324	0.577	0.670	0.317
NA64	22.279	23.710	23.521	23.342	3.498	4.352	4.351	4.196	0.854	0.355
NA65	21.972	22.616	23.323	23.237	3.493	3.258	4.143	3.991	0.087	0.955
NA66	23.823	24.406	24.925	5.242	5.268	5.496	5.679	0.205	0.751	0.537
NA67	23.823	24.406	24.925	5.242	5.268	5.496	5.679	0.205	0.751	0.537
NA68	측정안됨	측정안됨	측정안됨	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211
NA69	25.799	25.387	26.940	25.667	7.018	6.029	7.760	6.421	-0.985	1.380
NA70	24.531	25.482	27.160	26.707	5.795	6.134	7.980	7.461	0.384	0.554
NA71	24.152	24.378	24.811	24.547	5.382	5.020	5.631	5.301	0.955	0.952
NA72	22.888	23.508	24.331	24.602	4.177	4.550	5.151	3.956	0.396	0.394
NA73	측정안됨	측정안됨	측정안됨	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211
NA74	29.893	30.520	31.367	34.212	11.112	11.142	12.182	14.886	0.056	0.538
NA75	23.683	24.243	25.222	25.607	4.932	4.385	5.022	6.361	-0.637	1.015
NA76	21.776	21.766	22.972	22.356	3.995	2.411	3.752	3.113	-0.584	0.230
NA77	25.711	26.279	26.571	6.930	6.921	8.473	7.325	-0.069	1.068	0.343
NA78	25.306	25.774	26.477	26.212	6.525	6.363	7.257	8.966	-0.162	1.119
NA79	측정안됨	측정안됨	측정안됨	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211
NA80	측정안됨	측정안됨	측정안됨	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211
NA81	25.845	24.445	21.882	20.973	6.764	5.087	2.732	1.727	-1.687	3.342
NA82	24.884	25.252	26.413	6.103	6.103	6.904	6.353	7.165	0.301	0.574
NA83	35.750	35.404	35.950	35.950	#211	15.224	16.704	#211	-1.725	3.306
NA84	25.756	25.536	26.202	25.342	6.375	6.178	7.022	6.096	-0.752	1.737
NA85	32.280	32.191	32.191	38.888	13.489	#211	19.642	#211	#211	#211
NA86	24.937	25.554	26.480	26.133	6.156	6.196	7.300	6.387	0.940	0.943
NA87	31.119	30.843	31.119	32.542	11.173	15.163	#211	-0.791	1.713	0.153
NA88	26.573	26.285	28.977	28.200	7.792	6.927	9.737	8.954	-0.885	1.052
NA89	23.191	23.765	23.379	22.656	3.410	4.199	3.420	1.621	0.249	0.447
NA90	22.200	22.683	23.111	23.737	3.413	3.325	3.931	4.431	-0.694	0.579
NA91	22.200	22.683	23.111	23.737	3.413	3.325	3.931	4.431	0.512	0.592

TR41381	20.394	21.663	21.537	21.692	1.613	2.395	2.407	2.445	0.652	0.619	0.734	0.577	0.383	0.564	
TNF	24.972	24.742	24.73	22.812	6.191	5.393	5.393	3.566	-0.837	1.786	-0.598	1.514	-2.635	6.168	
TR54893	25.433	26.896	27.333	25.724	6.652	7.553	6.215	5.228	0.855	0.561	1.561	0.339	2.576	0.168	
TSC233	22.554	23.356	21.502	21.179	3.753	3.942	2.322	1.933	0.199	0.877	-1.431	2.696	-1.830	3.531	
USP2	20.982	21.410	20.729	20.616	2.303	2.032	1.580	1.370	-0.139	1.131	0.584	0.831	1.779		
USP54	26.748	26.364	27.638	26.992	7.967	7.006	8.458	7.746	-0.961	1.597	0.494	0.712	-0.221	1.165	
VEGFR	29.517	27.735	31.453	25.503	8.535	8.535	12.253	10.262	-2.658	6.332	1.247	0.421	-0.778	1.710	
VDLR	35.442	34.978	33.978	32.747	16.661	#211	14.799	#211	#211	1.862	3.635	#211	#211	#211	
XDH	26.393	26.393	24.374	25.162	24.997	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	
ZFP36	24.547	29.285	25.114	24.691	5.395	5.052	5.016	5.980	5.751	-0.036	1.625	0.928	0.526	0.616	
ZHX3	25.564	25.657	25.814	25.669	4.353	4.353	4.359	4.359	4.423	4.654	0.040	0.168	0.360	0.414	
ZNF281	23.594	15.664	15.466	15.976	3.597	3.597	3.594	-3.594	-3.714	-3.270		0.371	0.773	0.160	
ACTB	14.794	15.784	15.838	15.482	15.266	15.266	15.000	0.000							
SESN3	15.388	15.793	16.234	17.444	-3.353	-3.638	-3.946	-3.802							
SARDH	24.297	22.023	21.516	22.777	2.535	2.635	2.465	2.465	3.531						
HEPT1	15.092	14.837	15.934	15.362	-3.639	-4.524	-3.136	-3.234							
HP1PO	26.393	26.393	21.639	20.818	20.883	20.883	20.851	2.304	1.638	1.137					
HEDC	20.752	21.713	20.631	20.380	1.571	2.355	1.591	1.134							
RTC	20.792	21.628	20.786	20.481	2.011	2.271	1.600	1.235							
PPC	18.493	18.197	18.424	18.380	-0.268	-1.141	-0.756	-0.666							
PPC	18.557	18.359	18.491	18.255	-0.244	-1.095	-0.688	-0.591							
PPC	18.444	18.435	18.381	18.325	-0.317	-0.923	-0.799	-0.921							

RT2 글루코로티코이드 대항 SUDHL4 세포주에 대한 PCR 어레이 분석으로부터 구하여진 변화 및 Ct값

유전자	Ct _{inf}		Act (82M)		Cp44		Act (82M)		Cp44		Act (82M)		Cp44		
	DMSO	Scd44	Pred	조합	Cond44	Pred	조합	Cond44	Pred	조합	Cond44	Pred	조합	Cond44	
ATR188A	27.896	28.562	27.834	28.373	10.107	9.878	9.931	8.932	-1.229	2.344	-0.516	1.430	-1.115	2.166	
ATR1	26.932	25.936	25.774	25.560	7.336	7.118	6.955	7.738	-0.276	1.131	-0.435	1.366	0.384	0.761	
AK2	18.861	20.311	20.602	20.632	2.416	1.846	1.340	1.257	-0.576	1.485	-0.976	2.108	-1.259	2.393	
AMR03	23.234	23.533	23.780	23.795	7.973	6.024	6.582	6.530	-1.449	2.230	-0.631	1.834	-0.945	1.923	
ANGPT1A	29.764	29.825	29.326	30.167	11.903	10.570	10.854	11.060	-1.331	2.516	-1.047	2.066	-0.841	1.791	
ANXA4	26.547	28.777	26.973	28.392	10.656	8.217	8.143	8.746	-2.415	5.348	-0.896	1.853	-2.493	5.229	
APC1	측정인법		측정인법		측정인법		측정인법		#21		#21		#21		
ARE388	25.126	25.119	25.594	24.555	6.859	5.748	6.158	6.436	-0.541	3.455	-0.331	1.085	0.117	0.816	
ATPH	22.618	23.338	22.741	23.034	4.228	3.905	4.177	3.914	-0.843	1.794	-0.431	1.367	-0.934	1.884	
ATP4	39.323	38.778	38.988	38.352	13.386	12.322	10.193	6.619	0.146	0.904	-0.219	1.213	0.533	0.891	
ATL6	38.523	21.675	20.634	21.183	2.857	1.878	2.104	1.817	-1.018	2.627	-0.793	1.733	-1.086	2.114	
ATMIPR	측정인법		측정인법		측정인법		측정인법		#21		#21		#21		
CALCR	측정인법		측정인법		측정인법		측정인법		#21		#21		#21		
CE38A	38.833	31.206	29.782	30.862	13.326	10.626	10.626	10.235	10.133	-2.516	5.595	-0.303	1.232	-2.463	5.289
CE38B	24.507	23.911	23.944	22.658	4.812	5.138	4.846	5.803	0.716	0.584	0.228	0.634	1.391	0.821	
COL4A2	측정인법		측정인법		측정인법		측정인법		#21		#21		#21		
CREB1	22.966	22.973	22.983	22.816	4.550	4.237	4.602	4.202	-0.313	1.242	-0.658	1.682	-0.348	1.273	
CREB3	24.546	24.421	24.421	24.555	5.695	5.695	5.626	5.626	-0.436	1.494	-0.560	1.674	-0.549	1.443	
CREB3A	34.298	25.088	24.418	24.533	6.317	5.618	6.098	6.118	0.095	0.655	1.275	-0.198	1.248	1.241	
CTGF	측정인법		측정인법		측정인법		측정인법		#21		#21		#21		
CVB561	33.993	36.737	33.606	36.742	18.486	16.250	17.766	15.289	-4.236	18.844	-0.720	1.687	-3.197	9.170	
DBP14	21.247	21.455	21.854	22.681	4.415	3.098	2.484	2.543	-1.317	2.491	-1.931	3.813	-1.872	3.660	
DBR432	측정인법		측정인법		측정인법		측정인법		#21		#21		#21		
DUSP21	26.536	26.335	26.754	26.733	2.447	7.908	7.354	7.732	-0.443	1.365	-1.093	2.133	-0.715	1.541	
EN1	32.440	33.287	32.372	32.372	3.206	2.636	13.616	14.305	13.736	#21	#21	#21	#21	#21	
EN1D3	24.798	25.765	24.878	26.386	8.120	6.172	6.795	5.594	-1.998	3.994	-1.325	2.505	-2.525	5.780	
ERBP1	측정인법		측정인법		측정인법		측정인법		#21		#21		#21		
FKBP5	35.633	20.484	23.869	21.371	3.005	3.143	4.523	4.823	0.098	3.994	-1.522	2.984	-1.276	2.422	
FKBP9	36.693	31.763	33.262	32.391	4.781	5.655	14.766	15.379	#21	#21	#21	#21	#21	#21	
GDPR1	27.358	28.114	26.971	27.832	9.372	8.216	9.163	8.654	-4.356	2.566	-0.409	1.338	-0.918	1.889	
GRHR8	36.313	37.623	37.623	36.468	16.624	20.1	16.652	17.609	#21	0.384	0.880	0.880	-0.858	1.814	
GUT1	35.336	35.795	34.814	34.814	13.653	16.824	16.732	16.732	#21	#21	#21	#21	#21	#21	
GUO1	22.480	22.607	22.859	22.854	4.938	4.403	3.636	3.636	0.065	0.956	-0.402	1.381	-0.342	1.268	

KEP3	25.769	25.743	24.819	24.878	6.612	6.663	6.772	6.505	-0.549	1.463	0.460	0.895	-0.107	1.077
KA52	35.638	31.961	31.961	31.961	#211	13.205	16.557	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211
HNRPB1	22.567	22.577	22.558	22.558	4.292	3.821	4.036	3.963	-0.471	1.386	0.286	1.248	-0.323	1.256
HLG3	32.210	33.699	31.119	32.524	14.558	12.363	14.128	13.506	-1.835	3.719	-0.130	1.094	-0.752	1.684
HLR4	32.524	32.524	32.524	32.524	#211	17.503	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211
HL5	32.524	32.524	32.524	32.524	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211
HL6	32.527	33.589	31.985	33.408	15.142	13.239	14.618	13.953	-1.903	3.740	-0.524	1.438	-1.239	2.360
HL13	22.256	22.645	22.834	22.878	4.612	4.078	3.678	3.552	-0.534	1.448	-0.934	1.911	-1.060	2.085
HL9	26.816	27.456	26.769	27.572	9.306	8.013	8.485	8.112	-1.593	2.450	-0.823	1.767	-1.194	2.288
HLX	32.947	32.947	32.947	32.947	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211
HLR10	33.257	33.859	33.859	33.859	13.392	13.126	14.113	14.553	1.917	0.264	#211	#211	1.627	0.372
HL11	32.524	32.524	32.524	32.524	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211
HL24	23.416	24.375	23.522	23.341	5.075	4.766	5.264	4.712	-0.399	3.239	0.129	0.914	-0.363	1.286
HLH10	22.748	22.989	23.036	22.934	4.648	4.250	3.938	4.040	-0.388	1.369	-0.739	1.636	-0.608	1.524
HLH24	22.602	22.893	22.781	22.525	4.159	4.025	3.832	3.898	-0.245	1.176	-0.427	1.344	-0.361	1.284
HLH27	22.859	24.858	24.113	23.750	5.484	5.357	5.882	5.155	-0.127	1.062	0.403	0.756	-0.223	1.256
HLH28	35.705	35.705	35.705	35.705	#211	16.469	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211
HPD1	25.255	26.112	25.507	25.928	7.652	6.751	7.141	6.551	-0.911	1.880	-0.521	1.435	-1.111	2.150
PER1	24.612	24.926	24.373	25.007	6.741	6.217	5.935	5.968	-0.524	1.458	-0.786	1.724	-0.833	1.781
PER2	23.794	24.371	24.403	24.767	6.501	5.687	5.490	5.690	-0.834	1.888	-1.101	2.145	-1.411	2.659
PKK31	23.210	23.340	23.615	23.627	5.361	4.859	4.469	4.506	-0.932	1.416	-0.892	1.856	-0.855	1.669
PID1	32.524	32.524	32.524	32.524	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211
PLK1H1	27.292	27.868	27.684	28.448	16.482	8.928	8.897	8.558	-1.254	2.365	-1.285	2.437	-1.594	3.019
PLK1H2	23.793	24.224	23.865	23.951	5.685	5.110	5.253	5.095	-0.375	1.490	-0.432	1.349	-0.590	2.305
PLK2F2	21.562	21.920	21.841	21.890	3.624	3.085	2.949	2.798	-0.539	1.453	-0.675	1.597	-0.826	1.773
RA553	22.754	23.207	22.984	23.225	4.953	4.228	4.236	4.050	-0.731	1.660	-0.723	1.651	-0.909	1.878
RG552	24.383	25.145	24.619	24.312	6.546	5.914	6.174	6.179	-0.532	1.550	-0.372	1.294	-0.367	1.296
RHO8	30.760	32.584	30.984	31.155	12.889	11.338	13.613	12.056	-1.581	2.934	0.724	0.625	-0.833	1.781
RHOJ	32.524	32.524	32.524	32.524	#211	19.737	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211	#211
SEIN1	22.129	25.195	26.963	8.697	6.439	#211	3.485	2.258	4.783	4.783	-5.212	-5.212	32.085	
SGK1	25.886	25.898	26.513	25.449	7.183	7.757	7.182	6.837	0.574	0.672	-0.346	1.271	-0.003	1.001
SLC1046	37.655	34.857	34.335	38.026	19.760	15.589	15.886	18.951	-4.180	18.126	-3.824	14.662	-0.835	1.752
SLC9A2	26.295	27.345	26.633	27.795	3.489	2.877	8.494	7.592	-1.512	3.037	-0.593	1.933	-1.898	3.227
SLC12A5	27.847	28.548	27.725	28.610	9.744	8.969	9.573	9.143	-0.775	1.711	-0.171	1.126	-0.601	1.517
SN1A1	24.008	24.797	24.422	24.729	6.513	5.656	5.826	5.304	-0.887	1.799	-0.687	1.630	-1.209	2.312
SPH21	29.372	30.619	29.007	29.583	11.317	10.251	11.648	10.668	-1.086	2.034	0.334	0.795	-0.649	1.558
SP383	25.796	26.495	25.583	25.722	7.456	6.832	7.524	7.032	-0.624	1.544	0.688	0.954	-0.424	1.342

STATE5	24.653	25.174	24.791	24.858	6.592	6.905	6.203	5.948	-6.537	1.452	-0.369	1.309	-0.634	1.563
STATE8	21.985	22.553	21.983	23.716	3.453	3.152	3.342	3.232	-0.298	1.229	-0.268	1.254	-0.162	1.123
TBLDR1	20.755	20.805	20.835	20.821	2.555	2.093	1.834	2.052	-0.356	1.372	-0.721	1.648	-0.503	1.317
TNF	27.723	29.337	29.593	31.477	13.213	10.753	10.356	9.319	-2.458	5.495	-2.845	7.125	-4.192	18.272
TNFAL05	28.955	28.521	27.807	26.778	8.712	9.954	10.164	10.339	0.781	0.838	0.559	1.549	0.544	0.544
1SC2D3	21.819	21.132	23.384	22.896	4.630	4.028	2.461	3.115	-0.022	1.001	-2.169	4.437	-1.515	2.258
USP2	20.842	21.562	22.123	22.518	4.652	3.354	2.371	2.138	-0.688	1.611	-1.681	3.207	-1.914	3.768
USP54	26.333	26.652	33.996	27.307	9.041	15.234	7.981	7.629	6.183	6.014	-1.386	2.085	-1.412	2.661
VPR	27.497	28.330	26.956	28.621	16.355	8.200	9.359	8.793	-2.155	4.454	-0.996	1.934	-1.562	2.953
YDLR8	30.416	28.792	27.124	26.394	8.630	9.068	9.821	11.706	0.438	0.738	1.492	0.438	3.076	6.119
YCP4	즉 정 안瓿				#21.1	#21.1	#21.1	#21.1	#21.1	#21.1	#21.1	#21.1	#21.1	#21.1
ZFP36	28.715	24.705	24.739	24.562	6.275	6.034	5.735	6.312	-0.262	1.199	-0.551	1.455	-0.264	1.301
ZHK3	24.939	24.719	24.325	24.482	6.631	5.869	5.738	5.305	-1.047	2.086	-0.858	1.825	-1.311	2.481
ZNF281	23.423	23.881	23.813	23.935	5.653	5.057	4.910	4.719	-0.612	1.528	-0.759	1.692	-0.950	1.932
AC138	13.717	14.247	14.284	14.272	-3.994	-4.472	-4.724	-4.388						
BB280	32.748	33.993	33.798	33.266	6.000	6.000	6.000	6.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
GADPH	15.435	15.335	15.709	15.782	-2.494	-2.966	-3.136	-3.369						
HEAT1	21.349	21.358	21.582	21.314	2.948	2.826	2.387	2.645						
REB10	15.192	15.469	15.266	15.194	-3.072	-3.490	-3.592	-3.812						
NGC	즉 정 안瓿				#21.1	#21.1	#21.1	#21.1	#21.1	#21.1	#21.1	#21.1	#21.1	#21.1
R1C	24.372	24.153	24.388	24.673	3.407	2.632	2.182	2.668						
R1C	24.441	24.008	24.369	24.154	3.288	2.143	2.037	2.237						
R1C	21.504	21.337	21.387	21.560	3.234	2.602	2.186	2.800						
R1C	18.529	18.395	18.338	18.358	0.102	-0.418	-0.676	-0.175						
R1C	18.544	18.226	19.432	18.695	0.128	0.876	0.645	-0.160						
R1C	18.784	18.635	18.681	18.679	0.413	-0.675	-0.336	0.020						

[0226]

실시예 2

[0227]

화합물 44와 에베로리무스는 상승 작용하여, EZH2 돌연변이체 WSU-DLCL2 세포에서 세포주기 중 G1기에의 억류를 강화하고, 야생형 EZH2 SU-DHL-5 세포에서의 세포자살을 촉진한다.

[0228]

도 11의 패널 B 및 E에 있어서, 각각의 점은 초기 및 후기 세포자살에 있어서 게이팅된 세포(gated cell)들의 백분율 평균을 나타낸다(Annexin-V 포지티브, 평균 +/- S.D., n=3). 패널 C 및 F에서 진전 곡선상의 점들은 DNA 내용물에 의해 게이팅된 세포들의 평균 백분율을 나타낸다(PI 포지티브, 평균 +/- S.D., n=2). 패널 A에서, WSU-DLCL2 세포들에는 화합물 44 및 에베로리무스의 조합을 400:1의 일정한 비율로 처리하였다. 상기 조합은 CI 값 0.34 내지 0.003으로 매우 강력한 상승효과를 유도하는 것으로 나타났다. 패널 B에서, 세포자살 수준을 화합물 44(500 nM), 에베로리무스(5 nM), 또는 이것들의 조합(동일 농도들)으로 처리한 WSU-DLCL2 세포들에서 평가하였다. WSU-DLCL2 세포에서 세포자살이 증가하지 않았음이 확인되었다. 패널 C에서, 화합물 44 단독 처리시와 비교되게, 공동 처리시 세포주기 중 G1기의 유의적 증가가 관찰되었다. 패널 D에서, SU-DHL-5 세포들을 4000:3의 일정 비율로 조합 처리하였다. 이와 같은 조합은 CI값 0.135 내지 0.008로 매우 강력한 상승효과를 유도하는

것으로 나타났다. 패널 E에서, 화합물 44 단독 처리시와 비교되게, 공동 처리시(500 nM 화합물 44, 0.75 nM 에베로리무스) Annexin 포지티브 세포의 유의적 증가가 관찰되었다($p<0.0001$). 패널 F에서, 공동 처리시 세포주기 중 서브 G1기의 유의적 증가가 관찰되었다.

[0230] 실시예 3

화합물 44와 이브루티닙은 상승 작용하여, EZH2 돌연변이체 WSU-DLCL2 세포 및 암생형 EZH2 SU-DH-L5 세포에서의 세포 자살을 촉진한다.

도 12의 패널 B 및 E에 있어서, 각각의 점은 초기 및 후기 세포자살에 있어서 계이팅된 세포들의 백분율 평균을 나타낸다(Annexin-V 포지티브, 평균 $+$ S.D., n=3). 패널 C 및 F에서 진전 곡선상의 점들은 DNA 내용물에 의해 계이팅된 세포들의 평균 백분율을 나타낸다(PI 포지티브, 평균 $+$ S.D., n=2). 패널 A에서, WSU-DLCL2 세포들은 화합물 44 및 이브루티닙의 조합을 4:5의 일정한 비율로 처리하였다. 이와 같은 제제들의 조합은 CI값 0.39 내지 0.14로 강력한 상승효과를 나타내었다. 패널 B에서, 세포자살 수준을 화합물 44(500 nM), 이브루티닙(625 nM), 또는 이것들의 조합으로 처리한 WSU-DLCL2 세포들에서 평가하였다. 이와 같은 조합은, WSU-DLCL2 세포에서 세포자살의 시간 의존 상승적 증가가 일어났음이 확인되었다. 패널 C에서, 세포주기 분석은, G1기에 있는 WSU-DLCL2 세포들의 백분율이 시간 의존적으로 증가하였음(다만, 조합 처리후 가파르게 증가함)을 규명하였다. 패널 D에서, SU-DHL-5 세포들을 화합물 44:이브루티닙이 1:5의 일정한 비율로 처리하였다. 상기 조합은 CI값 0.222 내지 0.002로 매우 강력한 상승효과를 유도하였다. 패널 E에서는, 화합물 44 단독 처리시와 비교되게 ($p<0.0001$), 화합물 44(1000 nM) 및 이브루티닙(2500 nM) 공동 처리후 SU-DHL-5 세포의 Annexin 포지티브 염색 진하기의 상승적이면서도 시간 의존적인 증가가 관찰되었다. 패널 F에서, 조합 처리된 SU-DHL-5 세포들의 세포주기 분석은, 각각의 제제들의 단독 처리시와 비교되게, 상기 제제들의 공동 처리후 서브 G1기에 있는 모집단의 세포가 증가함을 규명하였다.

[0233] 실시예 4

화합물 44와 MK-2206은 상승 작용하여, EZH2 돌연변이체 WSU-DLCL2 세포 및 암생형 EZH2(SU-DH-L5 및 OCI-LY-19) 세포에서의 세포 자살을 촉진한다.

도 13의 패널 A에 있어서, WSU-DLCL2 세포들을 4:1의 일정 비율로 화합물 44 및 MK-2206의 조합으로 처리하였다. Fa-CI 플롯은 CI값 0.77 내지 0.005로 매우 강력한 상승효과를 나타낸다. 패널 B에서, 화합물 44(2000 nM) 및 MK-2206(400 nM)을 공동 처리할 때, Annexin 포지티브 WSU-DLCL2 세포 백분율은 시간 의존적으로 증가하였다. 패널 C에서, 세포주기 분석은 G1기에 있는 WSU-DLCL2 세포들의 백분율이, 화합물 44 단독 처리하였을 때와 비교되게 화합물 44 및 MK-2206을 공동 처리하고 나서 제1 일째되는 날에 가파르게 증가되었음을 규명하였다($p<0.0001$). 패널 D에서, SU-DHL-5 세포들을 화합물 44 및 MK-2206 2:1의 일정 비율로 처리하였다. 상기 조합은 CI값 0.276 내지 0.001로 매우 강력한 상승효과를 유도하였다. 패널 E에서, SU-DHL-5를 대상으로 행하여진 세포자살 수준 평가는, 화합물 44 단독 처리하였을 때와 비교되게, 24 시간 동안 공동 처리(500 nM 화합물 44, 250 nM MK-2206)를 행하였을 때 Annexin 포지티브 세포가 증가하였음을 규명하였다($p<0.0001$). 패널 F에서, 조합하여 처리한 SU-DHL-5 세포의 세포주기 분석은, 제제들이 개별적으로 처리되었을 때와 비교되게, 서브 G1기 모집단의 세포수 백분율 증가를 나타내었다. 패널 G에서는, 화합물 44 및 MK-2206 조합 처리에 의해 OCI-LY19 세포에서 1/α 값 71.4로 강력한 상승효과가 관찰되었다. 패널 H에서는, OCI-LY19 세포들을 조합 처리하였을 때(1000 nM 화합물 44, 2500 nM MK-2206), 화합물 44 단독 처리하였을 때와 비교되게 세포자살의 시간 의존적 증가가 나타났다($p<0.0001$). 패널 I에서, 조합 처리된 OCI-LY19 세포들의 세포주기 분석은 세포주기의 서브 G1기에 있는 세포들이 시간 의존적으로 증가하였음을 규명하였다($p<0.0001$).

[0236] 실시예 5

화합물 44와 BCR 경로 억제제의 조합으로 인한 표적 유전자들의 조절

도 14의 패널 A에서, WSU-DLCL2 세포에서의 화합물 44와 이브루티닙의 조합으로 인한 EGR1 및 FOS의 하향 조절(각각 단일 제제 투여시의 40 배 및 4 배)은, 단일 제제로 인한 EGR1 및 FOS의 하향조절과 비교된다. 패널 B에서, WSU-DLCL2 세포에서의 화합물 44와 MK-2206의 조합으로 인한 AICDA 및 TCL1A의 상향조절(각각 단일 제제 투여시의 3 배 및 5 배)은, 단일 제제로 인한 AICDA 및 TCL1A의 상향조절과 비교된다. 패널 C에서, SU-DHL-5 세포에서의 화합물 44와 이브루티닙의 조합으로 인한 GJA1의 상향조절(단일 제제 투여시의 3 배)은, 단일 제제 투여로 인한 GJA1의 상향조절과 비교되었다. 통계학적 분석에 대한값은 2 회 또는 3 회 반복 실험의 평균 $+$ SD이다(t 검정, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$).

[0239] 실시예 6

[0240] 배 중심 B 세포주에 있어서 EZH2 억제와 BCR 신호전달 경로 조정, BCL2 억제와 GR 길항작용 사이의 상승적 상호 작용들

[0241] 본 연구에서는, DLBCL 생물학에 연루된 신호전달 경로의 핵심 작동자들을 사용하여 몇몇 상승적 조합들을 규명하였다(도 15 참조). B 세포 수용체 경로의 소절 표적화 억제제, 예를 들어 PI3K/Akt/mTOR 신호전달 케스케이드의 억제제, MAPK 케스케이드의 MEK1/2, SYK 및 BTK는, 돌연변이체 EZH2 보유 GCB 세포주들로부터 야생형 아형의 세포주들에 이르기까지 EZH2 억제의 영향력을 확장하는 EZP-6438과 병용될 때, 매우 강력한 상승효과를 나타내었다. 단백질의 BCL-2과의 억제제, 오바토클락스, 나비토클락스 및 ABT-199는, 화합물 44와의 조합시 상승적인 항증식 활성을 나타내었다. 글루코코르티코이드 수용체 작동제, 프레드니솔론 및 텍사메타손은 돌연변이체 세포주에 있어서 EZH2 억제의 극적인 증가를 나타내고, EZH2i에 야생형을 감작시킨다. 리툭시맙, 즉 R-CHOP의 화학요법제와 결합된 항체는 cd-20을 표적화하여, 돌연변이체 세포주에서 시험관 내 증가된 항증식 효과를 유도해낸다.

[0242] 실시예 7.

[0243] 화합물 44와 에베로리무스는 상승 작용하여, 돌연변이체 WSU-DLCL2 세포들 중 S기 및 G2/M기에 있는 세포들, 그리고 야생형 SU-DHL-5 세포들 중 G1, S 및 G2/M기에 있는 세포들의 모집단을 감소시킨다.

[0244] WSU-DLCL2, SU-DHL-5 및 OCI-LY19(데이터는 나타내지 않음) 세포들을 화합물 44(WSU 및 SU-DHL-5의 경우 500 nM)로 전처리한 후, 화합물 44와 에베로리무스의 조합(WSU: 5 nM, SU-DHL-5: 0.75 nM)으로 공동 처리하였다. 도 16의 패널 A에 있어서, WSU-DLCL2 세포들을 단일 제제 또는 이 제제들의 조합으로 처리할 때, 세포주기의 서브 G1기에는 변화가 나타나지 않는다. 패널 B 및 C에 있어서, WSU-DLCL2 세포들을 조합으로 처리할 때, 세포주기 중 S기와 G2/M기에 있는 세포들은 각각 시간에 의존하는 상승적 감소를 나타낸다. 패널 D, E 및 F에 있어서, SU-DHL-5 세포들이 공동 처리되고 나서 48 시간 경과시, 세포주기 중 G1, S 및 G2/M 기에 있는 세포들 각각의 상승적 감소를 나타낸다.

[0245] 실시예 8

[0246] 화합물 44와 이브루티닙은 상승 작용하여, 돌연변이체 WSU-DLCL2 세포들 그리고 야생형 SU-DHL-5 세포들 중 G1, S 및 G2/M기에 있는 세포들의 모집단을 감소시킨다.

[0247] WSU-DLCL2, SU-DHL-5 및 OCI-LY19(데이터는 나타내지 않음) 세포들을 화합물 44(WSU: 500 nM, SU-DHL-5: 1000 nM)로 전처리한 후, 화합물 44와 이브루티닙의 조합(WSU: 625 nM, SU-DHL-5: 2500 nM)으로 공동 처리하였다. 도 17의 패널 A, B 및 C에 있어서, WSU-DLCL2 세포들을 단일 제제로서 화합물 44 또는 이브루티닙으로 처리하였을 때와 비교되게, 조합 처리하고 나서 24 시간 경과시, 세포주기의 G1, S 및 G2/M기에 있는 세포들은 상승적으로 감소하였다. 패널 D, E 및 F에 있어서, SU-DHL-5 세포들을 공동 처리하고 나서는, 단일 제제로서 화합물 44 또는 이브루티닙으로 처리되었을 때와 비교되게, 세포주기 중 G1, S 및 G2/M 기에 있는 세포들 각각의 시간에 의존하는 상승적 감소를 나타낸다.

[0248] 실시예 9

[0249] 화합물 44와 MK-2206은 상승 작용하여, 돌연변이체 WSU-DLCL2 세포들 그리고 야생형 SU-DHL-5 및 OCI-LY19 세포들 중 G1, S 및 G2/M기에 있는 세포들의 모집단을 감소시킨다.

[0250] WSU-DLCL2, SU-DHL-5 및 OCI-LY19 세포들을 화합물 44(각각 2000 nM, 500 nM, 1000 nM)로 전처리한 후, 화합물 44와 MK-2206의 조합(각각 400 nM, 250 nM 및 2500 nM)으로 공동 처리하였다. 도 18의 패널 A에 있어서, WSU-DLCL2 세포들을 MK-2206과 조합 처리하였을 때, 세포주기의 G1기에는 시간 의존 상승적 감소가 나타난다. 패널 B 및 C에 있어서, WSU-DLCL2 세포들을 조합 처리하였을 때, 세포주기 중 S기 및 G2/M기에 있는 세포들의 상승적 감소가 각각 나타난다. 패널 D, E 및 F에 있어서, 단일 제제 처리시와 비교되게, SU-DHL-5 세포들을 공동 처리하고 나서 48 시간 경과시에는 세포주기 중 G1, S 및 G2/M 기에 있는 세포들의 상승적 감소가 각각 나타난다. 패널 G, H 및 I에 있어서, OCI-LY19 세포들을 조합 처리하였을 때, 세포주기 중 G1, S 및 G2/M기에 있는 세포들의 시간 의존 상승적 감소가 각각 나타난다.

[0251] 야생형 및 EZH2 돌연변이체 보유 DLBCL 세포주들에 대한, 화합물 44와 개별 SOC, 또는 기타 선택되는 제제들의 조합이 사용되는 증식 연구들의 결과들은 표 5에 나타내어져 있다.

[0252]

[표 5]

[0253]

증식 연구의 결과들

	WSU-DLCL2		SU-DHL-10		SU-DHL-5		DOHH2	OCI-LY19	Toledo
화합물	CR	CI 또는 1/ α	CI 또는 1/ α	CI 또는 1/ α	CI 또는 1/ α	범위 또는 1/ α	1/ α	1/ α	1/ α
프레드니솔론		9.7		4.2		7.6	9.5	4.2	효과없음
넥사메타손		17 ^b		3.7	400: 1	0.42- 0.076	4.2	7.7	효과없음
ABT-199	4:3	0.27- 0.002	3:2 00	1.2-1.4 ^e		효과없음	1.9 ^b	4.20	1.9 ^b
나비토클락스	1:5	0.42- 0.067	1:1 00	0.90-0.36 ^a		효과없음	1.5 ^b	6.60	효과없음
오바토클락스	40: 3	1.10 ^e	1:1	0.91-1.36 ^e	320: 1	1.26- 1.61 ^e	1.4 ^b	1.50	1.1 ^b
이브루티닙	4:5	0.39-0.14	0	0.78-0.062	1:5	0.22- 0.002	0.67	효과없음	효과없음
이델랄리십	1:5	0.31- 0.062	3:2 00	0.64-0.02	2:5	0.24- 0.000025	0.59	효과없음	1.1
에베로리무스	400: 1	0.34- 0.003	100: 3	0.65-0.14	4000: 3	0.14- 0.008	0.83	효과없음	효과없음
타마티닙	1:5	0.24- 0.025	3:5 0	1.1 ^e - 0.061	1:5	0.57- 0.19	0.81	효과없음	효과없음
트라메티닙	1:5	0.45-0.16		5.6 ^b	2:5	0.031- 0.001	1.2 ^b	효과없음	효과없음
MK-2206	4:1	0.77- 0.005	3:2 0	0.56-0.04	2:1	0.28- 0.001	0.64	71.40	1.7 ^b
리툭시맙		2.6							
보르테조맙	400: 3	1.4-1.3 ^e	15: 1	1.5-1 ^e	1600: 1	1.00	0.96	1.67	0.96

CR = 조합 비율, CI = 복합 지수

CI 범위는 분수 효과

0.5 초과함

a-1 회의 실험을 기반으로 하였으며, 다른 실험 결과들은 6438 의 최고 농도와 약물 단독의 최고 농도 사이의 IC₅₀ 변동 값임.b-알파 값을 산정할 수 없었으므로, IC₅₀ 변동이 보고됨

c-DMSO 농도 대신 개별 6438 에 대해 정규화된 DOHH2 데이터

d-리툭시맙 농도 (μg/mL)

e-이와 같은 CI 값들은 1 과 유의적으로 상이하지 않았음.

[0255]

증식 분석에서 사용된 화합물들의 효능과, 각각의 세포주에서 적용된 용량 범위들은 표 6에 나타내어져 있다.

[0256]

[표 6]

[0258]

화합물의 효능 및 용량 범위

	GCB 이형 EZH2 Y646F		GCB 아형 WT EZH2							
	WSU-DLCL2		SU-DHL-10		SU-DHL-5		DOHH-2		OCI-LY19	
	효능 (nM)	약물 범위 (nM)	효능 (nM)	약물 범위 (nM)	효능 (nM)	약물 범위 (nM)	효능 (nM)	약물 범위 (nM)	효능 (nM)	약물 범위 (nM)
프레드니 솔론	90.6	7.8- 1000	>1000	1000	39	7.8- 5-80	0.62 133	7.8- 1000	0.78- 47	7.8- 1000
액사메타 손	>1000 0	0.78 -100	>100	-100	3.4	0.78 8-10	0.07 5.6	1.56 -200	0.078 79	0.78- -10
ABT-199	1942	23.4 3000	- 3037	1000 0	>1000 0	78- 1000	78- 1000	7.8- 1000	1.56- 53	4.69- 600
나비토클 락스	3539	78- 1000	78- >10,0	1000	>1000	78- 1000	78- 1000	78- 1000	15.6- 131	11.7- 1500
오바토클 락스	59	1.2- 50	0.78 -100	9.8	0.39 -50	0.39 51	1.56 -200	1.56- 42	1.56- 200	1.17- 96
이브루티 닙	277.7	39- 5000	277.7 1146	187- 3000	312- 1327	312- 5000	39- 956	39- 5000	78- >10000	78- 10000
이델랄리 십	2046	78- 1000	1250 - 1000	78- 1000	78- 1000	78- 1000	78- 1000	78- 10000	78- 10000	78- 10000
에베롤리 무스	0.653	0.03 9-5	0.09 0.854	0.09 -6	0.09 0.72	0.09 -3	0.07 0.13	0.07 8-5	7.8- ND	0.078 1000
타마티닙	3415.2	78- 1000	312.5- 5000	313- 1000	78- 1000	78- 1000	78- 1000	78- 10000	78- 10000	78- 10000
트라마티 닙	8608	78- 1000	78- >10,0	78- 1000	78- >1000	78- 1000	78- 1000	78- 000	78- prism)	78- >1000
MK-2206	127	7.8- 500	7.8- 274.6	7.8- 500	7.8- 162	7.8- 1000	7.8- 86	7.8- 1000	7.8- 304	7.8- 1000
리툭시맙	>10 ^a	10- 0.39 ^a								
보르테조 맙	6.5	0.94 -7.5	5.0- 8.6	0.04 20	0.04 4	0.07 -5	0.07 6.6	0.23- 8-10	0.23- 12	0.12- 30
화합물	44	31- 310	31- 2000	3.1- 73	3.1- 200	62- 3300	>1000- 4000	31.3 2000	125- >10000	15.6- 8000

[0259]

	GCB 이형 EZH2 Y646F		GCB 아형 WT EZH2							
	WSU-DLCL2	SU-DHL-10	SU-DHL-5	DOHH-2	OCI-LY19	Toledo				

a-리툭시맙의

농도(µg/ml)

나열된 IC₅₀ 값들은, Toledo의 경우(5 일

동안 투여된 후 산정됨)를 제외하고 3 일

동안 투여된 후에 산정됨.

화합물 44의 IC₅₀ 값들은, 모든 세포주에 대해

Toledo의 경우(11 일 동안 처리된 후 산정됨)를

제외하고 7 일 동안 처리된 후에 산정됨

[0260]

참고문헌으로서의 포함

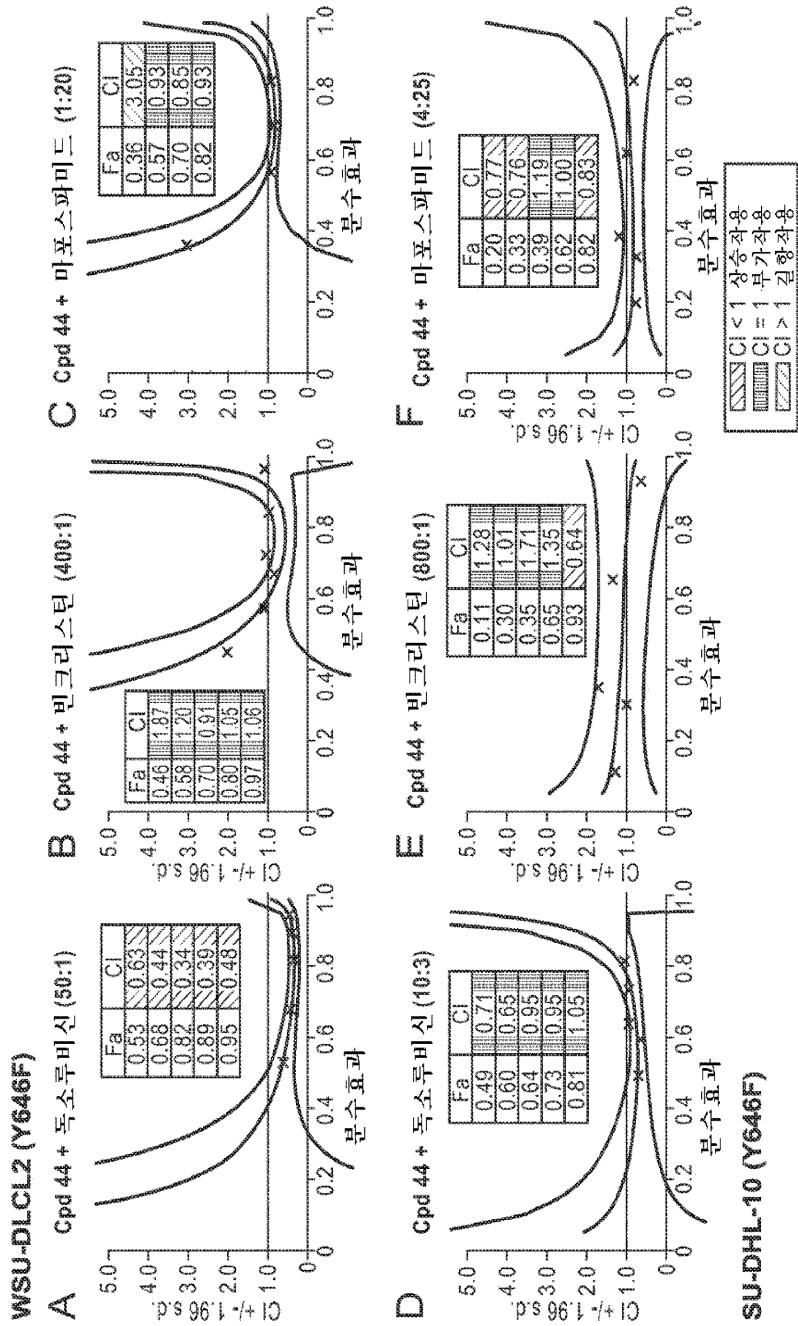
[0262] 본원에 인용된 모든 간행물들과 특히 문서들은, 마치 이러한 간행물이나 문서 각각이 본원에 참고로 포함되어 있다고 구체적으로 그리고 개별적으로 기술된 것처럼, 본원에 참고로 포함되어 있다. 간행물들과 특히 문헌들에 관한 인용은 임의의 문헌이 선행 기술과 관련되어 있음을 인정하는 것으로서 의도되지 않을 뿐만 아니라, 이러한 문헌의 내용이나 날짜에 관하여 어떤식으로든지 인정하는 것을 구성하는 것도 아니다. 당업자는, 이제 서술된 설명에 의해 기술된 본 발명을 다양한 구현예들로 실행할 수 있으며, 상기 설명과 그 뒤에 오는 실시예들은 설명의 목적을 위한 것이지, 이하에 첨부된 청구항들을 제한하는 것은 아님을 인지할 것이다.

[0263] **균등률들**

[0264] 본 발명은 본 발명의 사상이나 본질적인 특징들로부터 벗어나지 않고 다른 특정 형태로서 구현될 수 있다. 따라서, 상기 구현예들은 모든 관점에서 본원에 기술된 발명을 제한한다기보다는 예시하는 것으로서 간주될 것이다. 그러므로 본 발명의 범주는 상기 설명에 의하기 보다는 첨부된 청구범위에 의해 지정되며, 청구항의 균등 범위와 의미에 속하는 모든 변화들은 본 발명에 포함되어야 한다.

도면

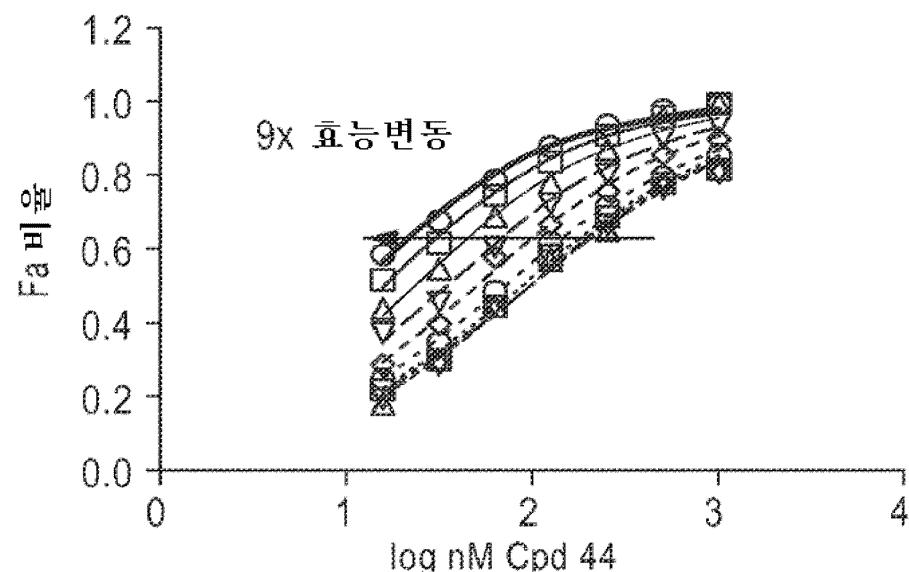
도면1



도면2a

WSU-DLCL2 (Y646F)

Cpd 44 + 프레드니솔론

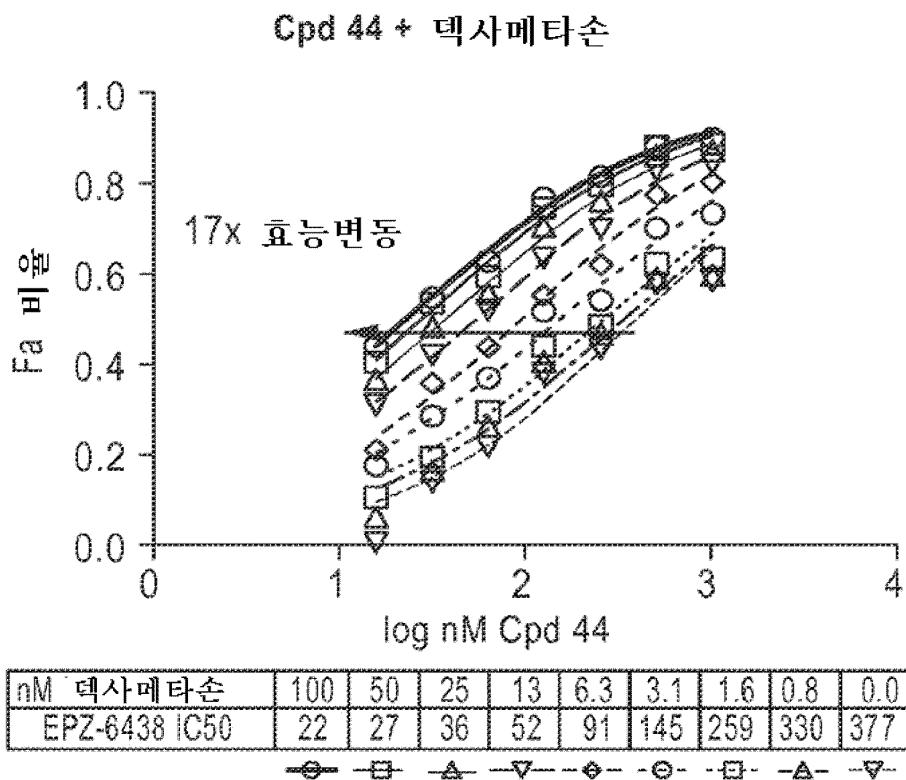


log nM 프레드니솔론	1000	500	250	125	62.5	31.3	15.6	7.8	0.0
EPZ-6438 IC ₆₀	18	26	38	58	83	121	150	162	167

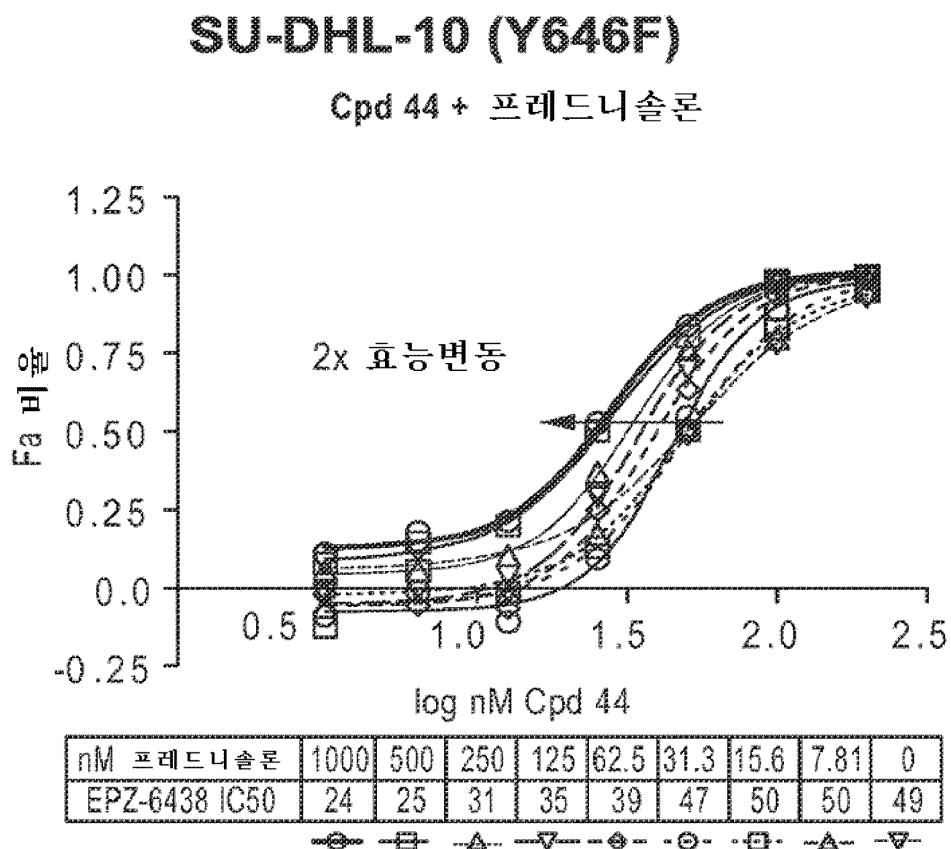
Legend below the table:

- ◆ - - - - - 1000
- - - - - - 500
- ▲ - - - - - 250
- ▽ - - - - - 125
- ◆ - - - - - 62.5
- - - - - - 31.3
- △ - - - - - 15.6
- ▽ - - - - - 7.8
- - - - - - 0.0

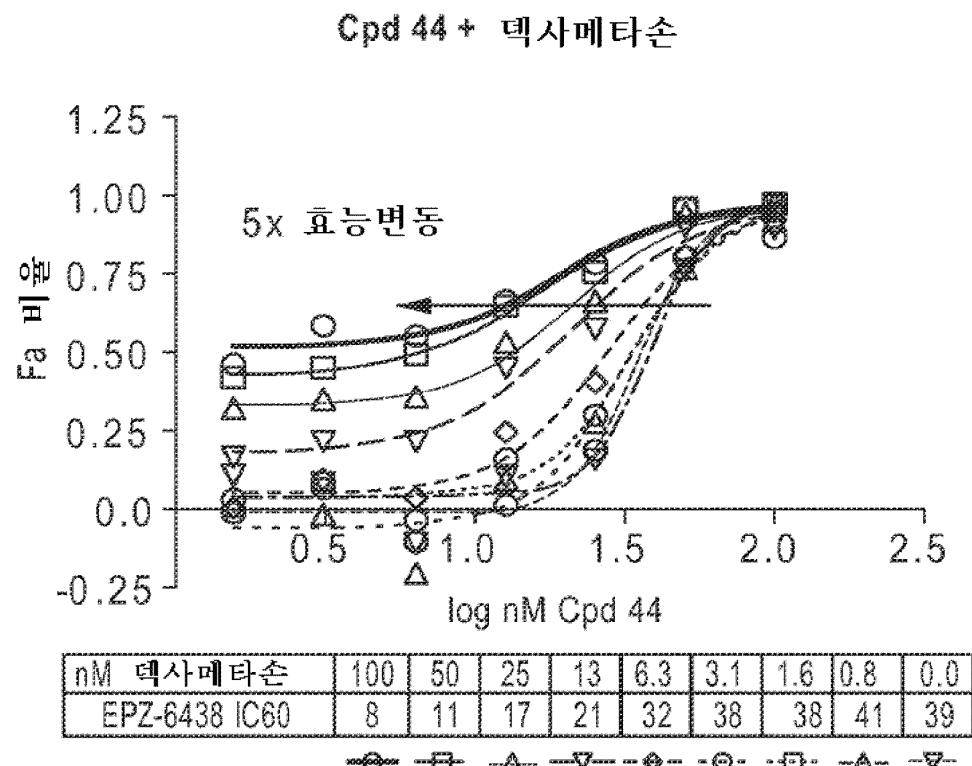
도면2b



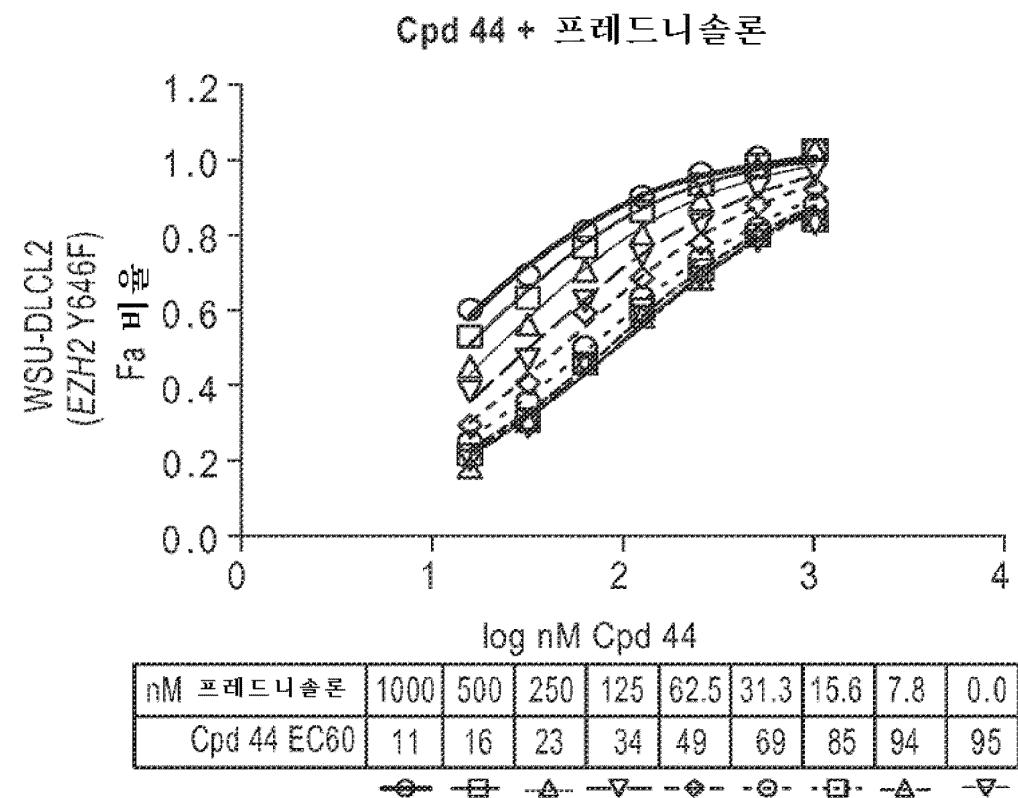
도면2c



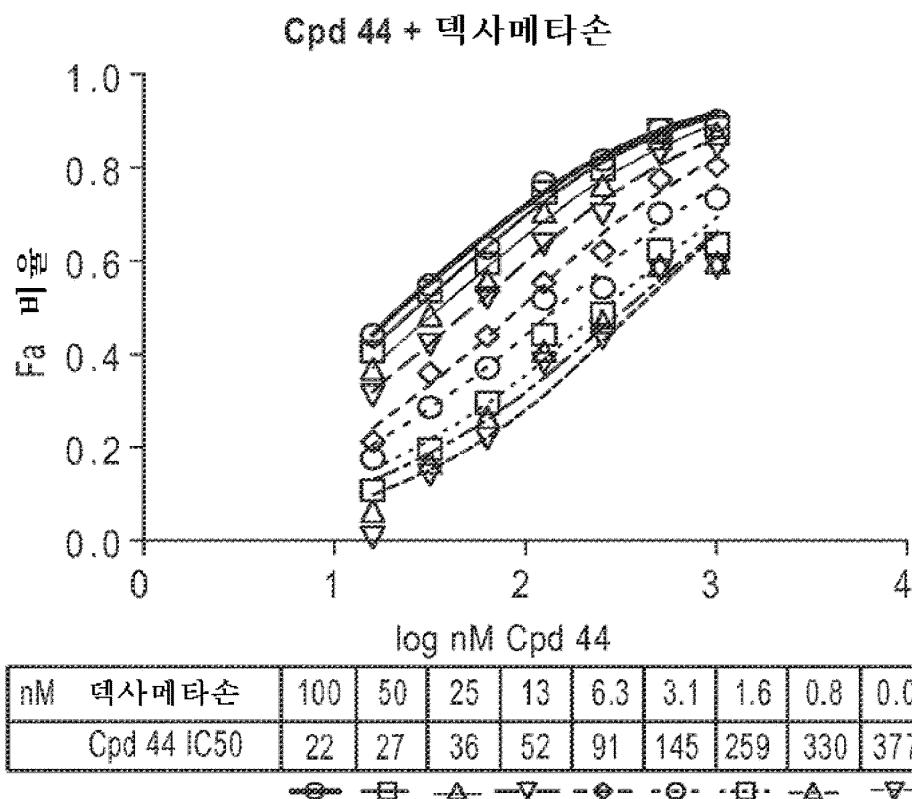
도면2d



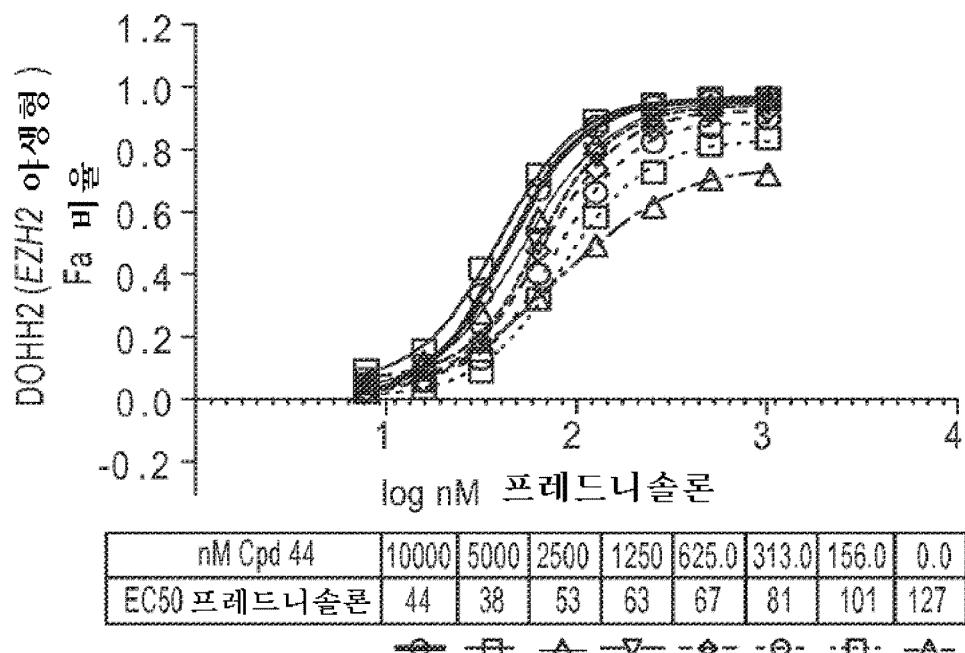
도면3a



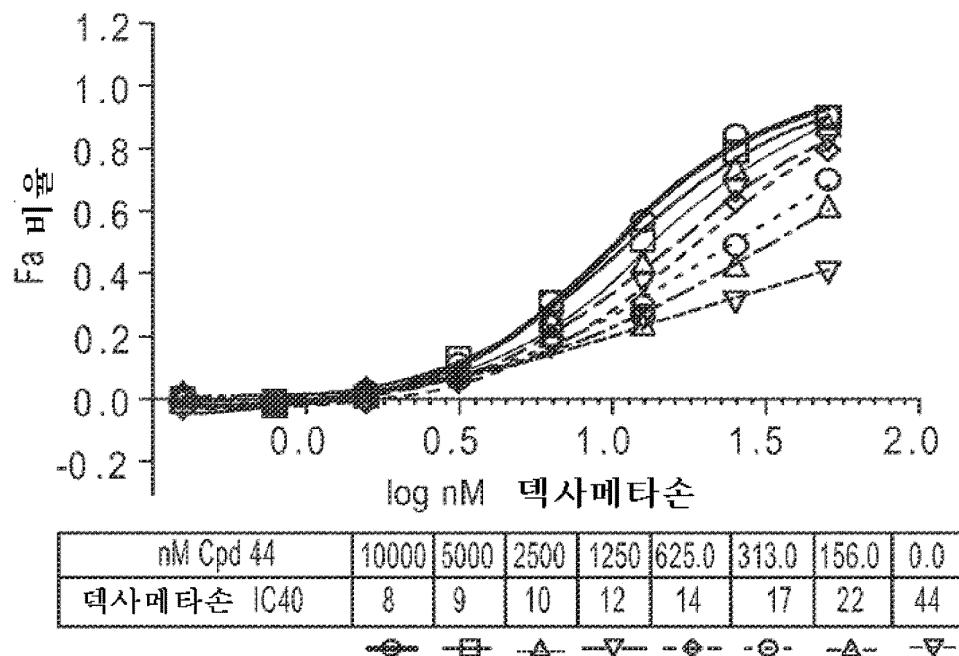
도면3b



도면3c



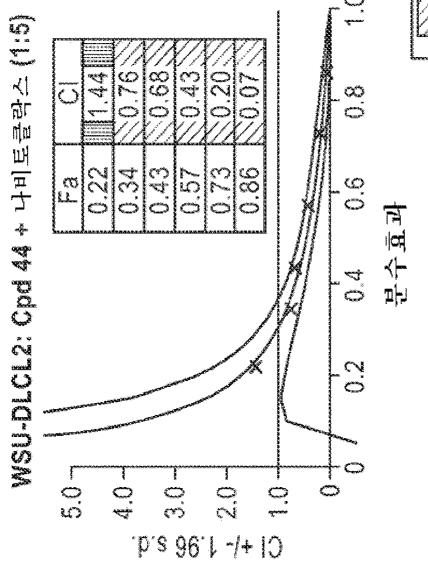
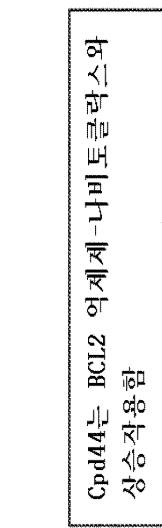
도면3d



도면4

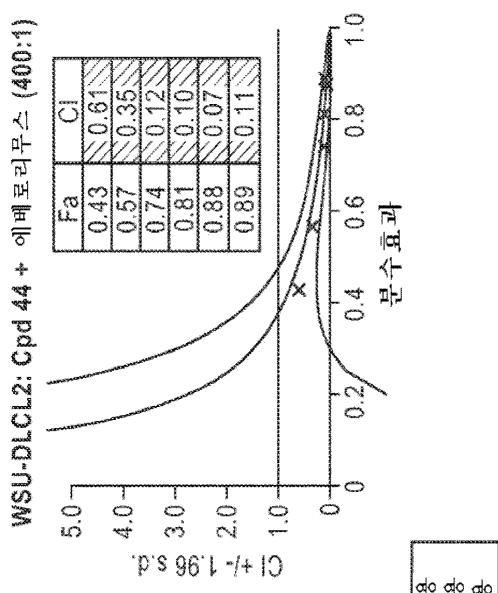
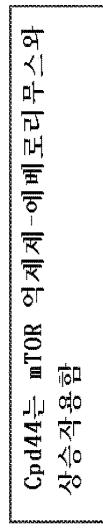
세포주	4일 Cpd44 C50 (uM)		7일 Cpd44 C50 (uM)	
	Cpd44 단독처리	Cpd44 공동처리	4일 Cpd44 전처리/ 3일 공동처리	4일 Pred 전처리/ 3일 공동처리
WSU (Y646-Sens)	0.53 +/- 0.014	0.020 +/- 0.021	0.011 +/- 0.0062	>1
SU-DHL10 (Y646-Sens)	0.64 +/- 0.26	0.0092 +/- 0.0044	0.0027 +/- 0.0013	0.52, >1
RL (Y646-Res)	>1	0.0096 +/- 0.0066	<<0.004	0.38
SU-DHL4 (Y646-Res)	>1	>1, 0.2, >1	0.035 +/- 0.043	>1
DOHH2 (WT)	>1	0.20 +/- 0.25	>1, 0.03, >1	>1
OCI-LY19 (WT)	>1	0.19 +/- 0.11	0.0055 +/- 0.0047	>1

도면5



A

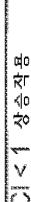
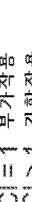
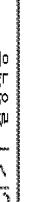
B



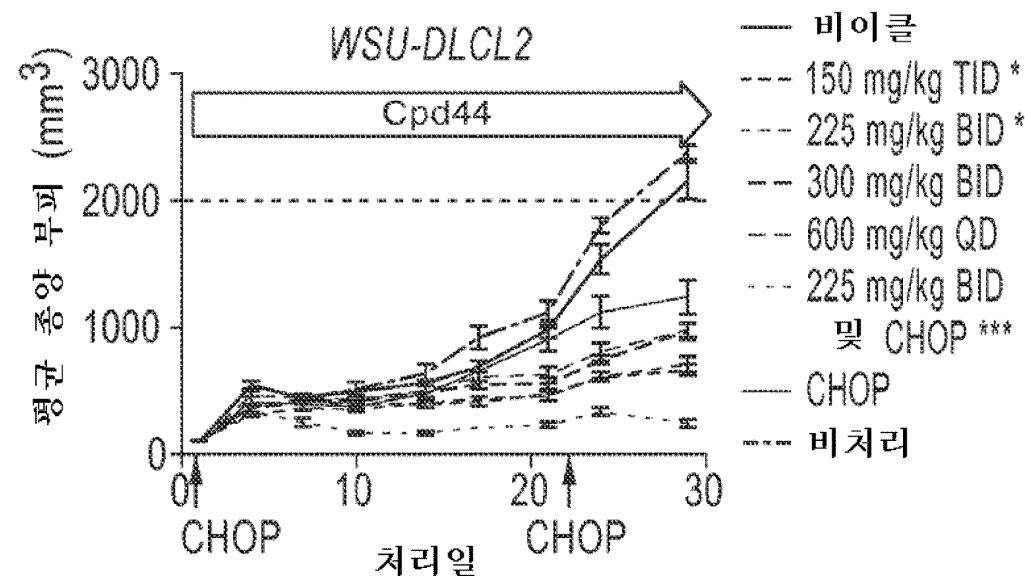
도면6

		WSU-DLCL2 (EZH2 돌연변이체 GCB)	SU-DHL-10 (EZH2 돌연변이체 GCB)	Toledo (WT EZH2 GCB)	DOHH2 (WT EZH2 GCB)
치료기준 DLBCL	프레드니솔론	7X 효능증가	2X 효능증가	효과없음	2X 효능증가
	독소루비신	상승작용	부가작용	효과없음	효과없음
	마포스파미드	부가작용	부가작용	효과없음	효과없음
	민크리스틴	부가작용	부가작용	효과없음	효과없음
	시스플라틴	상승작용	부가작용	효과없음	효과없음
	AraC	상승작용	부가작용	효과없음	효과없음
	보리노스타트	부가작용	부가작용	효과없음	효과없음
	보리노비노스타트*	부가작용	테스트 안됨	테스트 안됨	테스트 안됨
	아자시타빈*	부가작용	테스트 안됨	테스트 안됨	테스트 안됨
	에베로리무스	매우강한 상승작용	강한 상승작용	효과없음	효과없음
기타 치료제들	덱사메타손	15X 효능증가	5X 효능증가	효과없음	4X 효능증가
	나비토클락스	매우강한 상승작용	2X 효능증가	테스트 안됨	효과없음
	오바토클락스	부가작용	부가작용	효과없음	효과없음

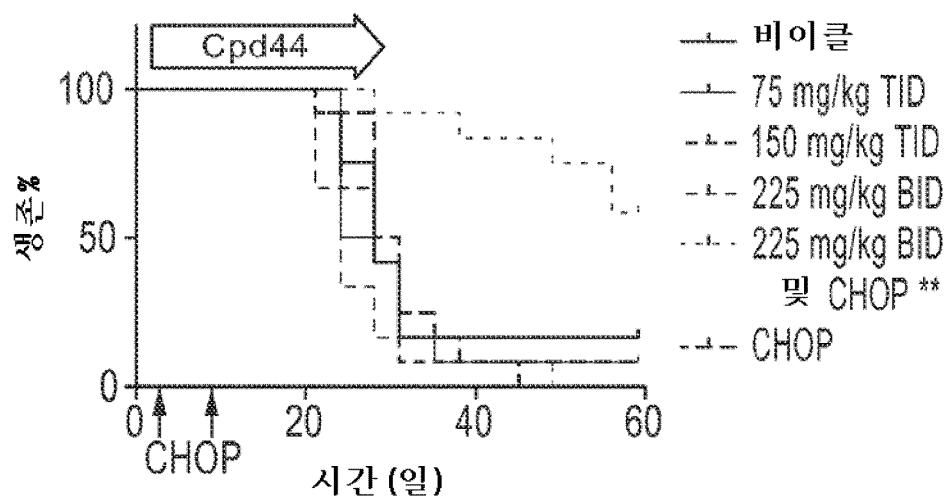
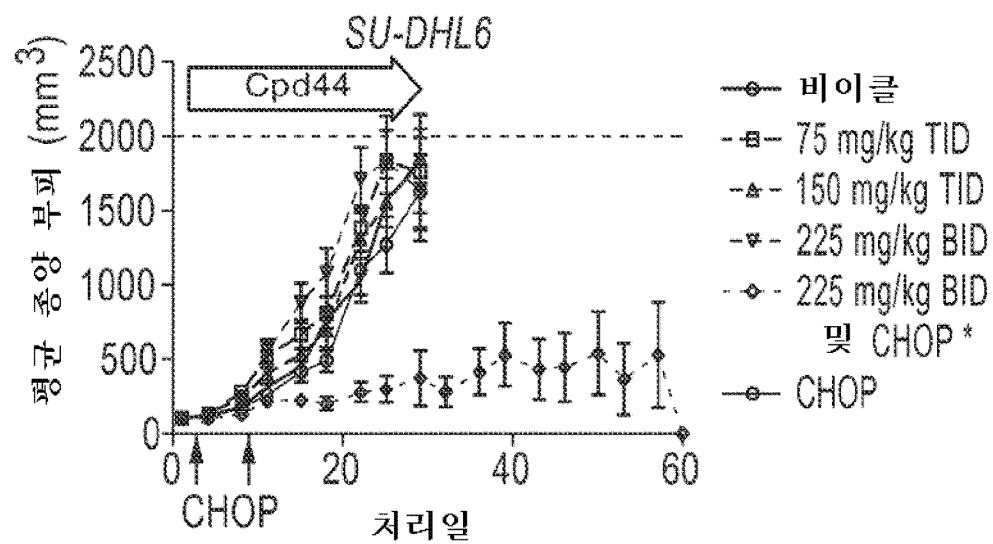
효과없음 = Cpd44 첨가시 약물 IC50에 변화가 없음
*실험들은 Cpd44대신 EZH1 를 화합물이 사용되어 수행됨

	C < 1	상승작용
	C = 1	부가작용
	C > 1	길항작용

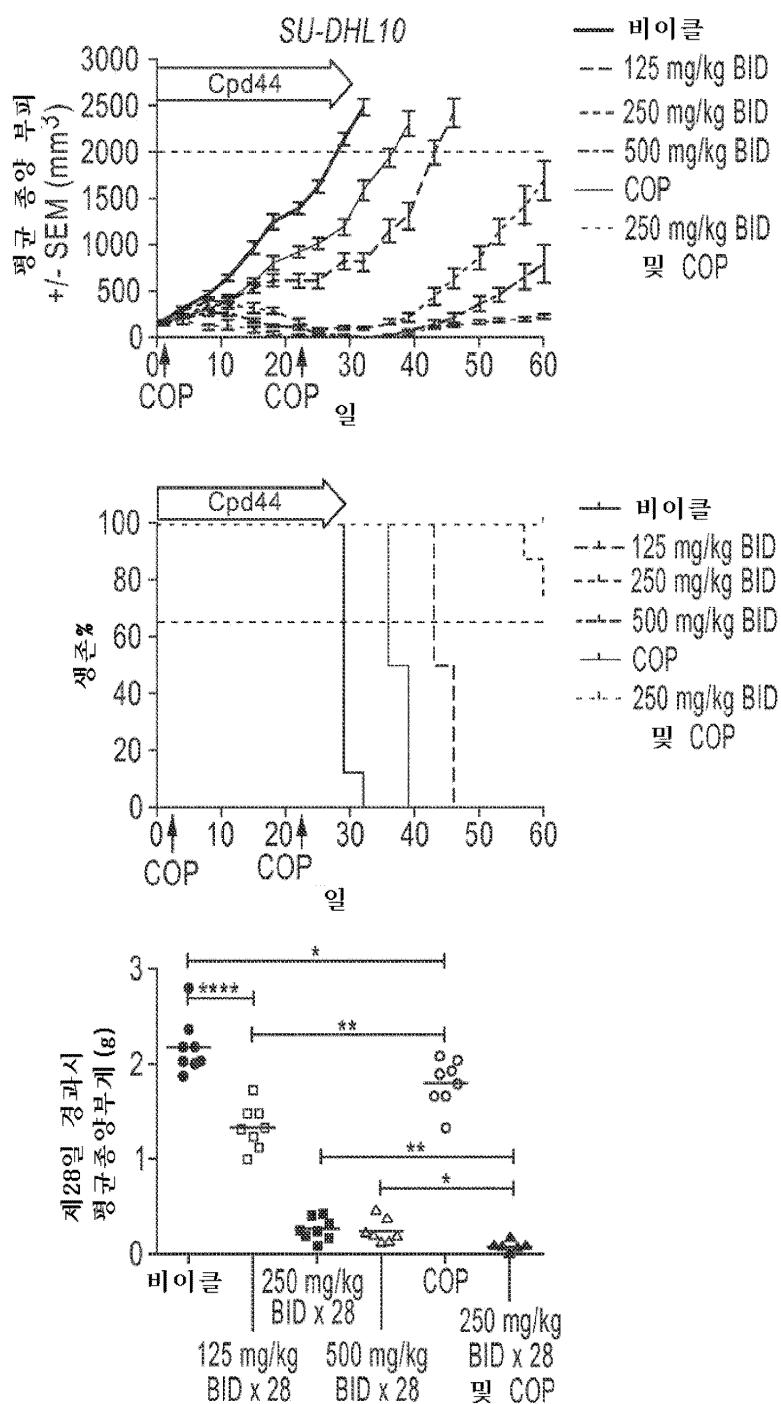
도면7a



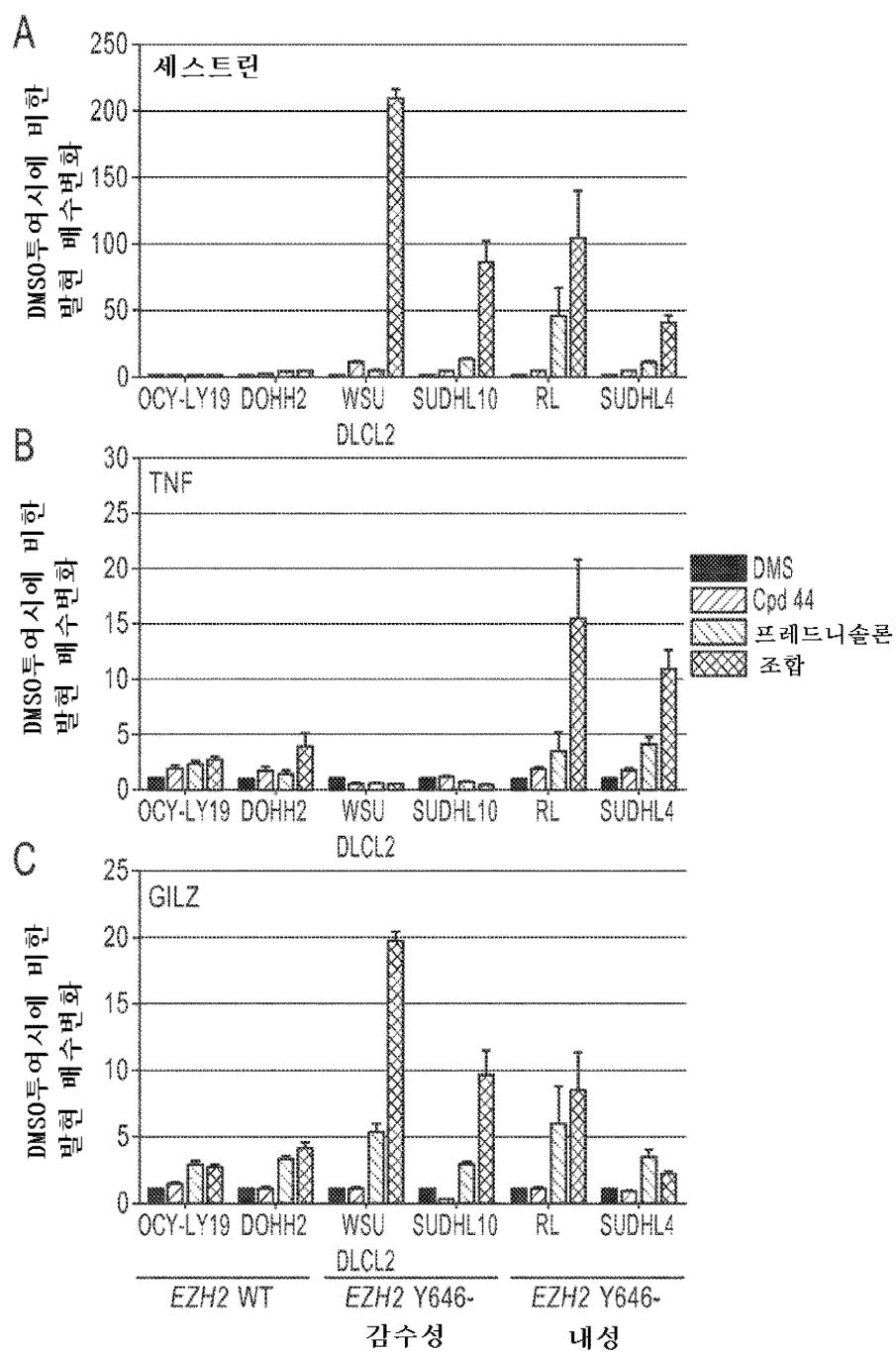
도면7b



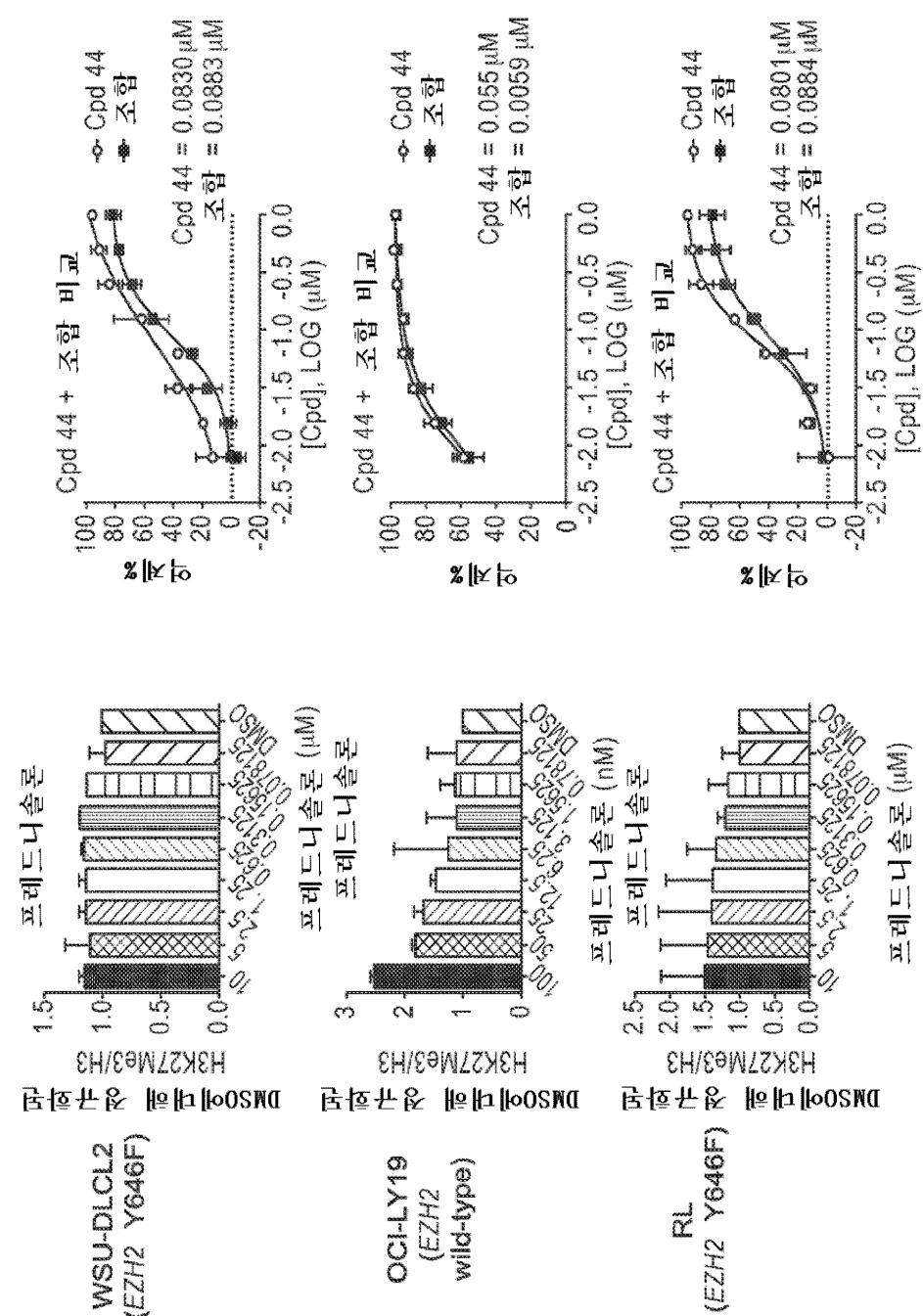
도면7c



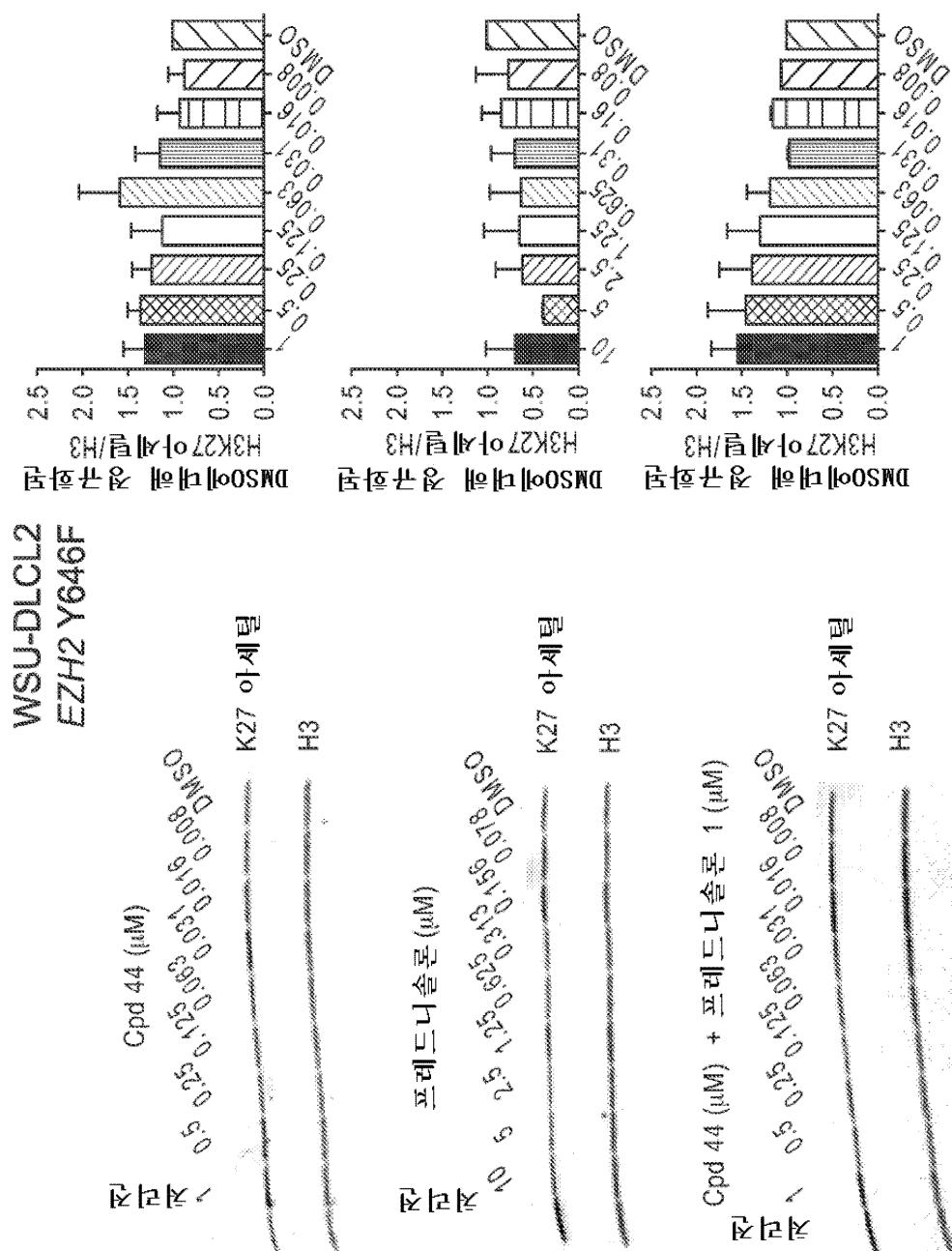
도면8



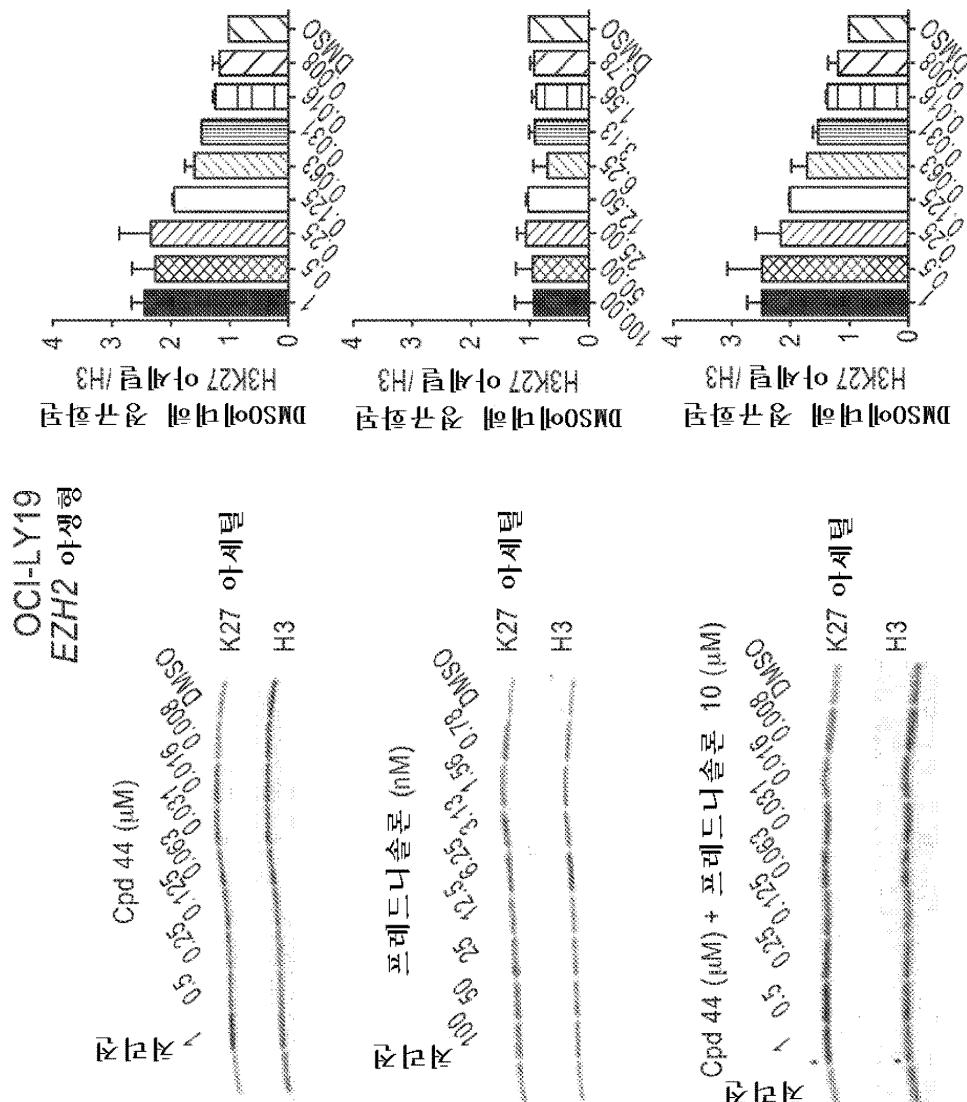
도면 9a



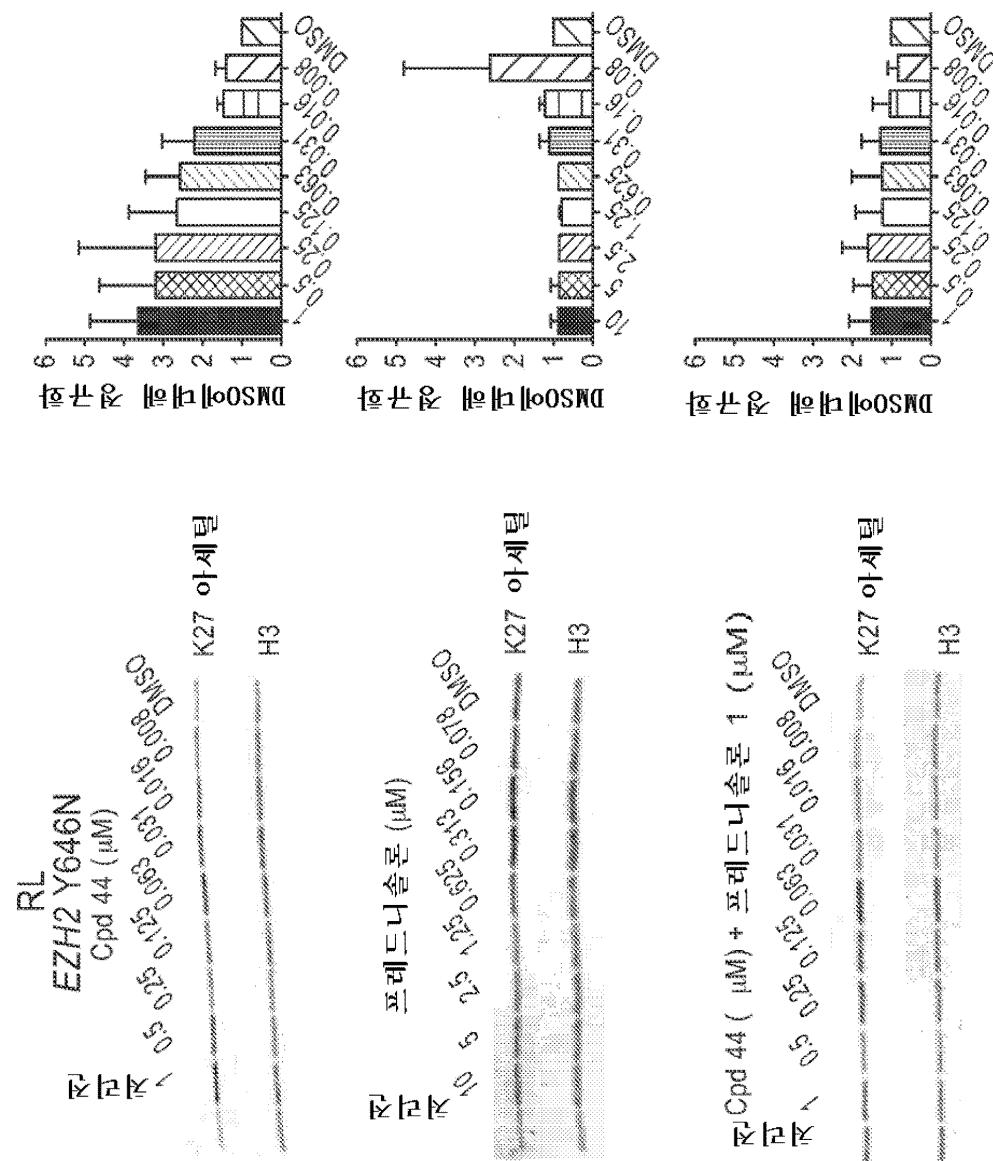
도면9b



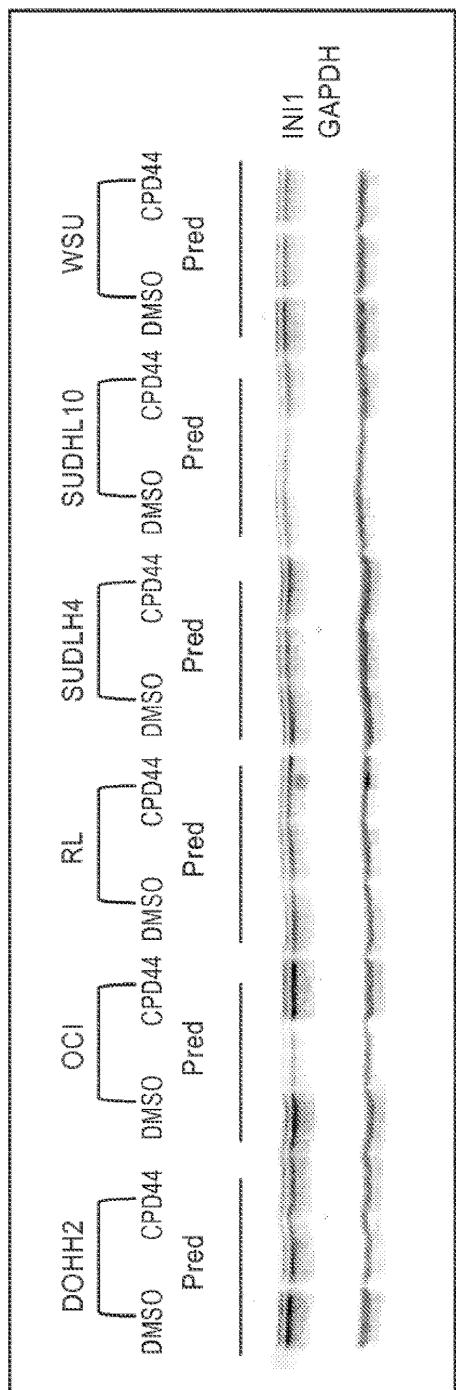
도면9c



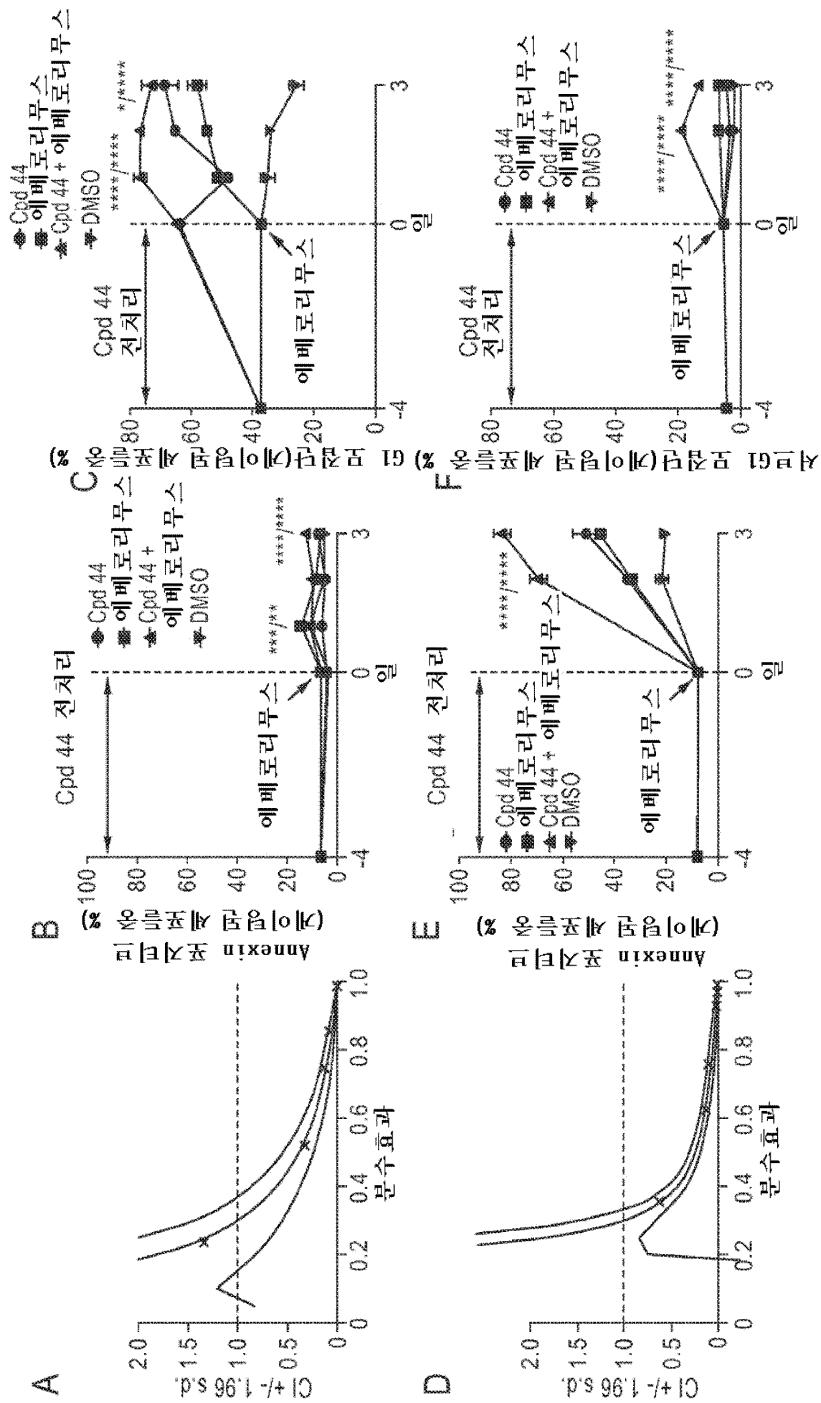
도면96



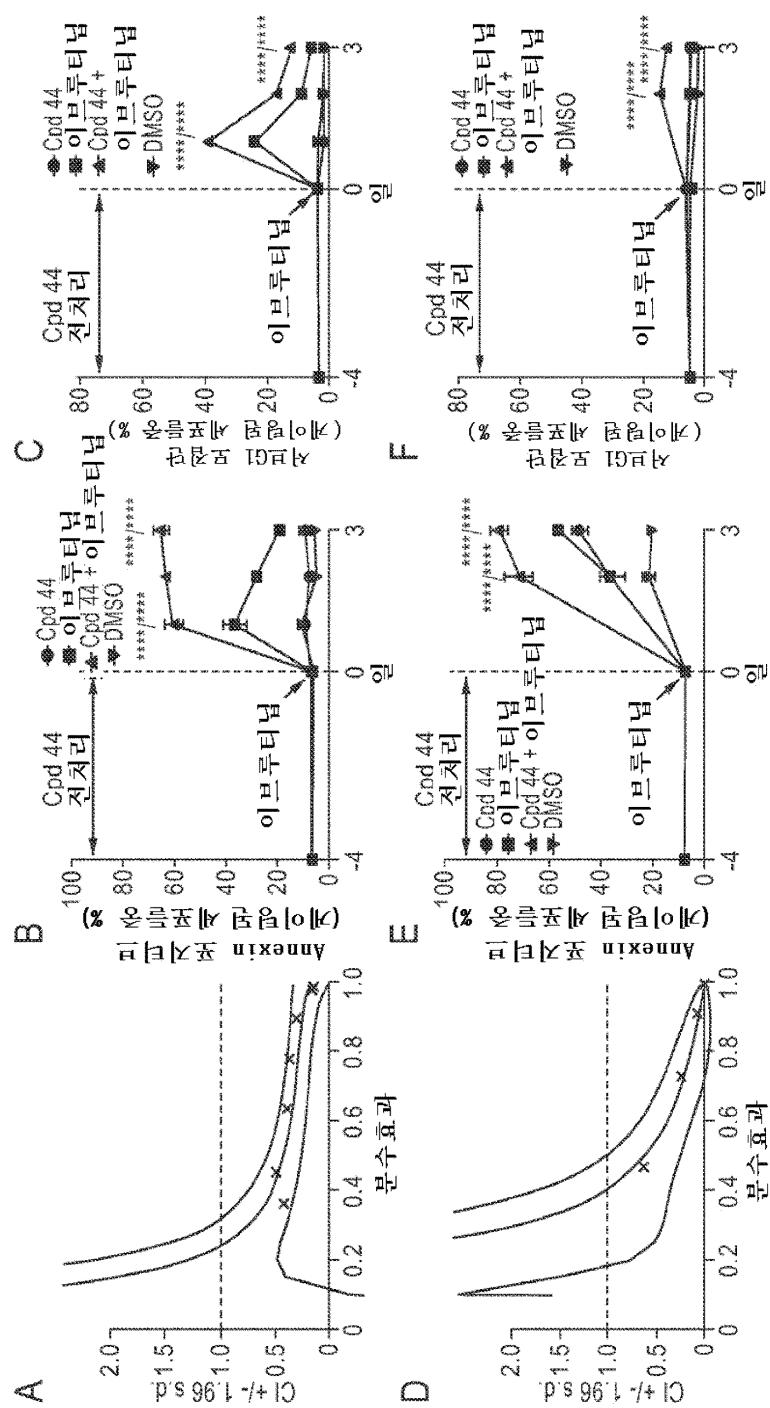
도면10



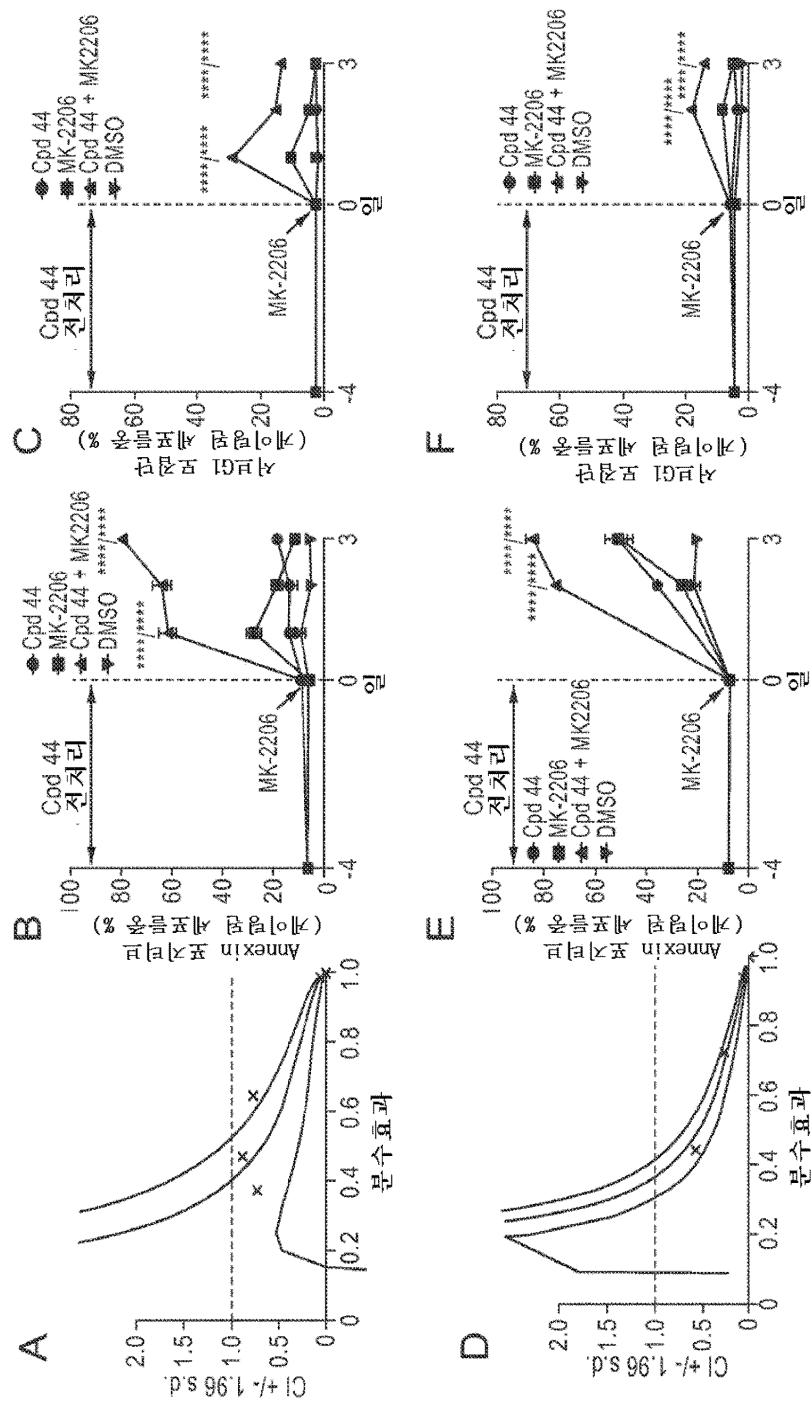
도면11



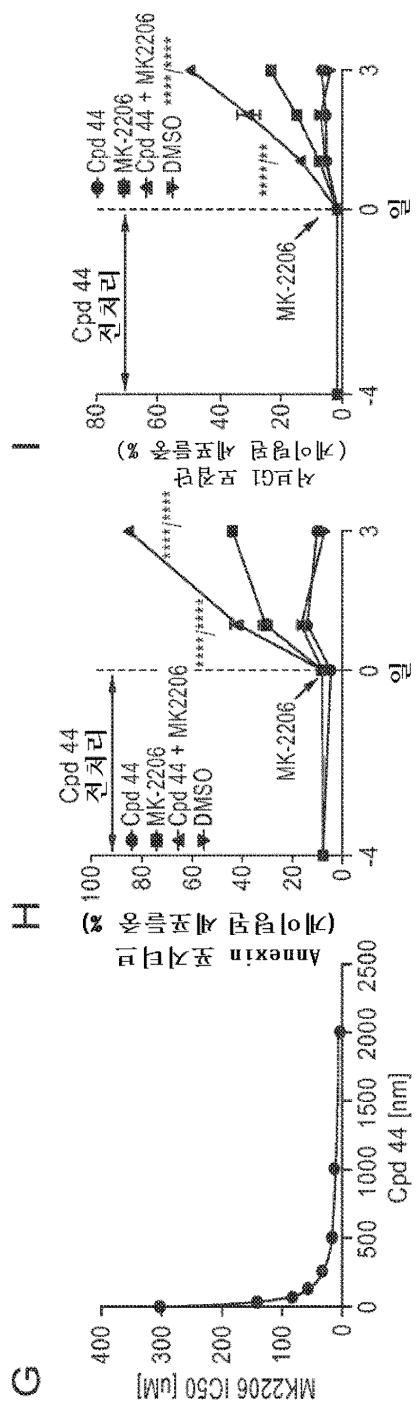
도면12



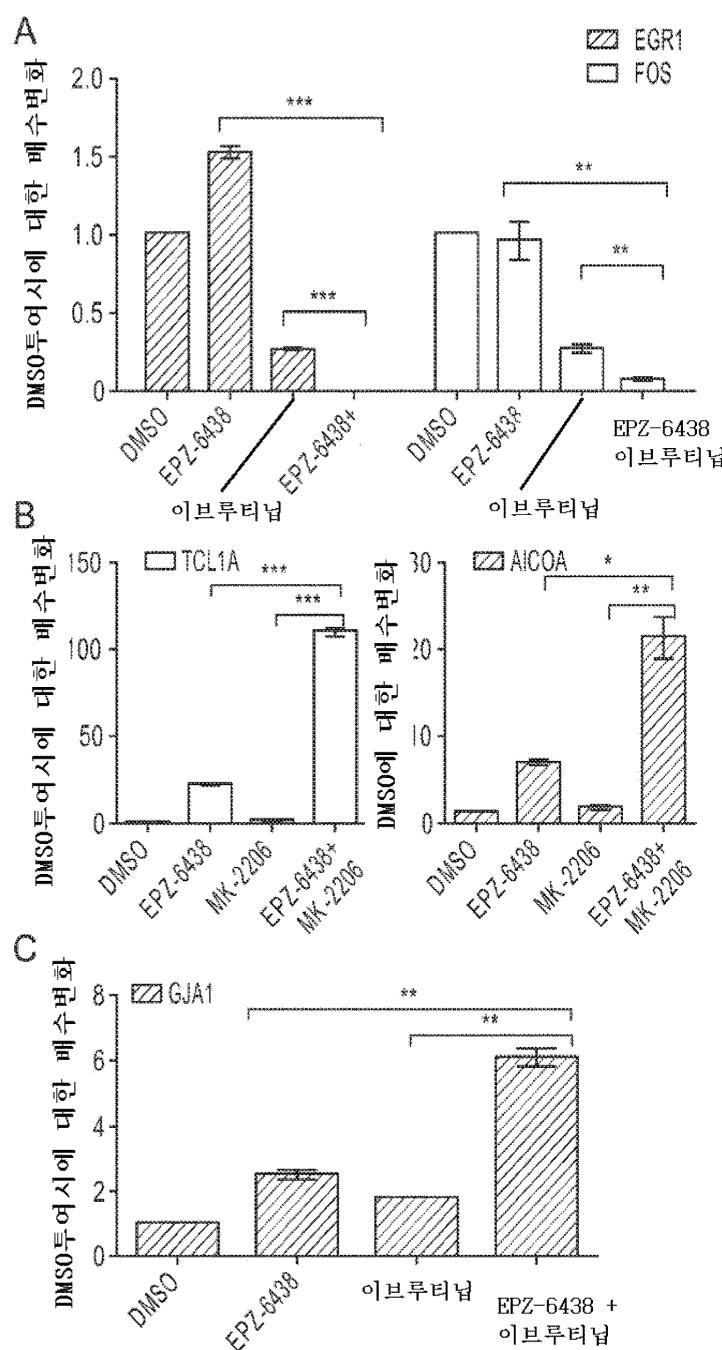
도면 13a



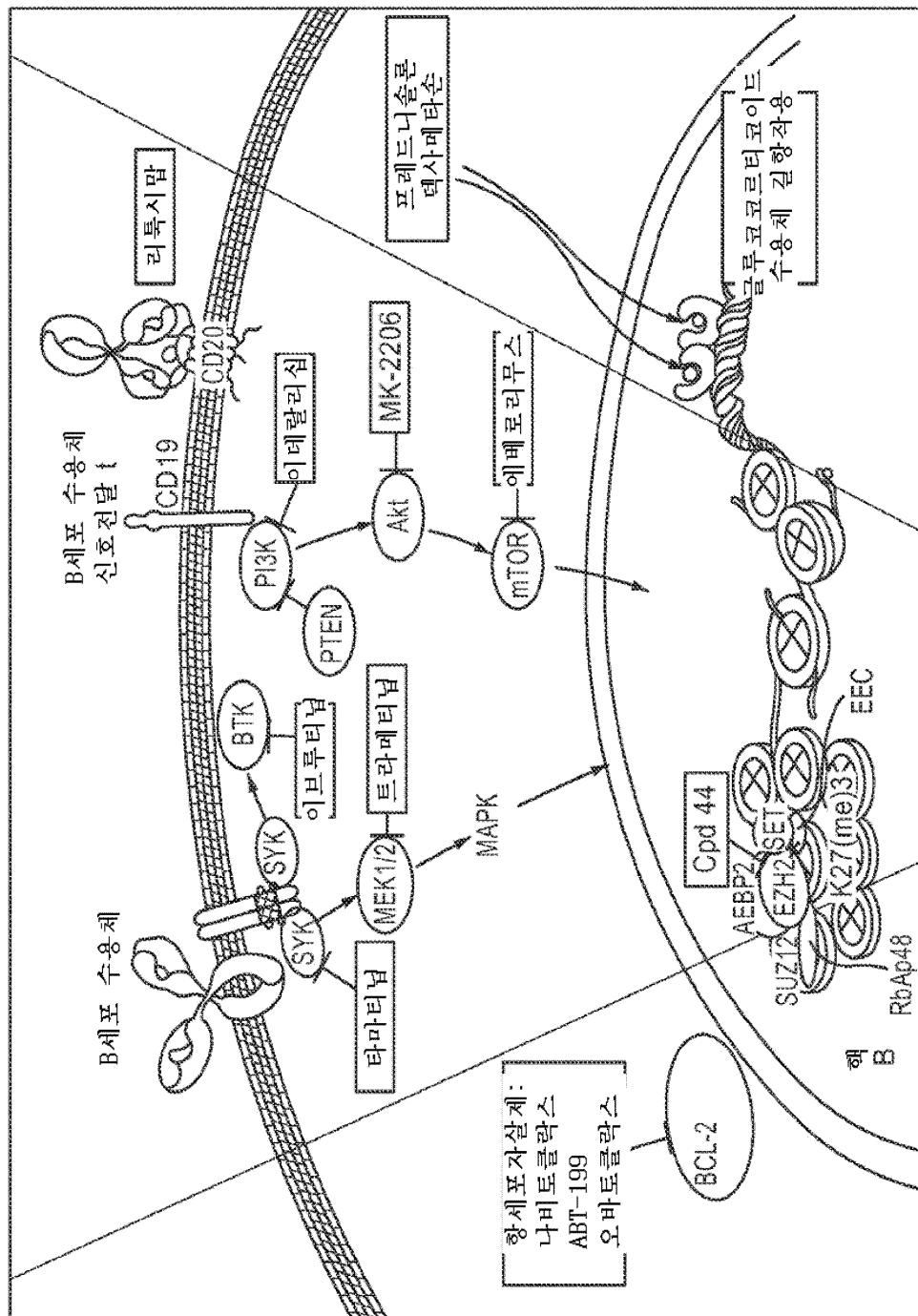
도면 13b



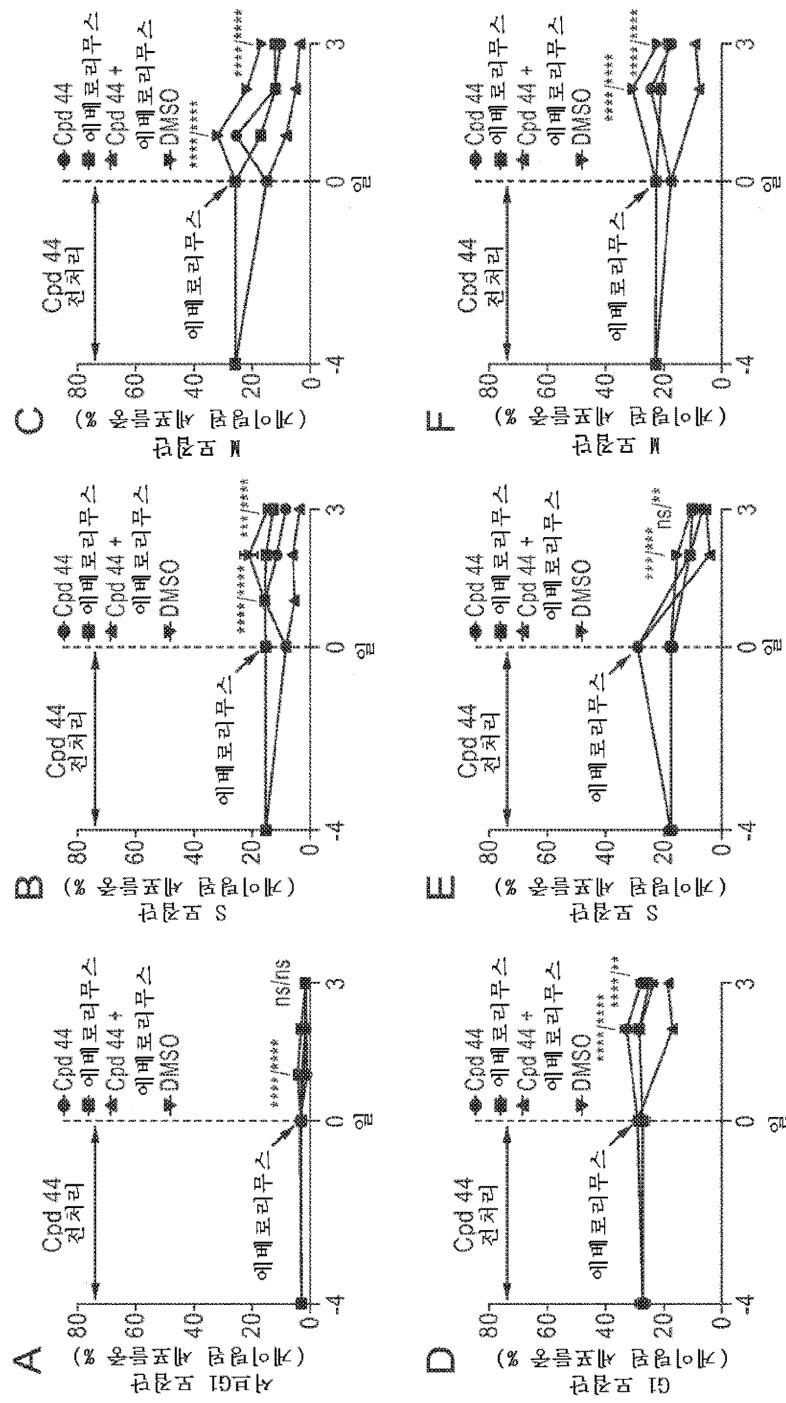
도면14



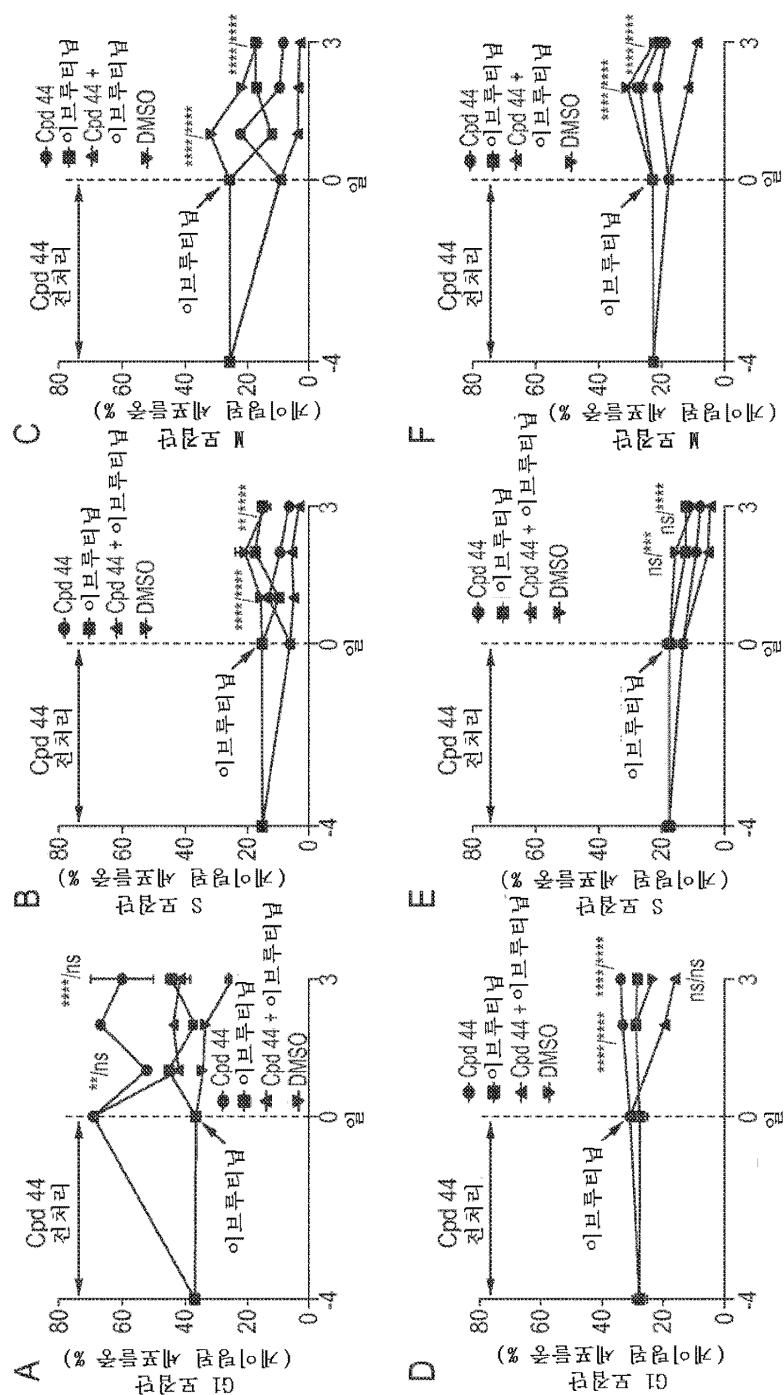
도면15



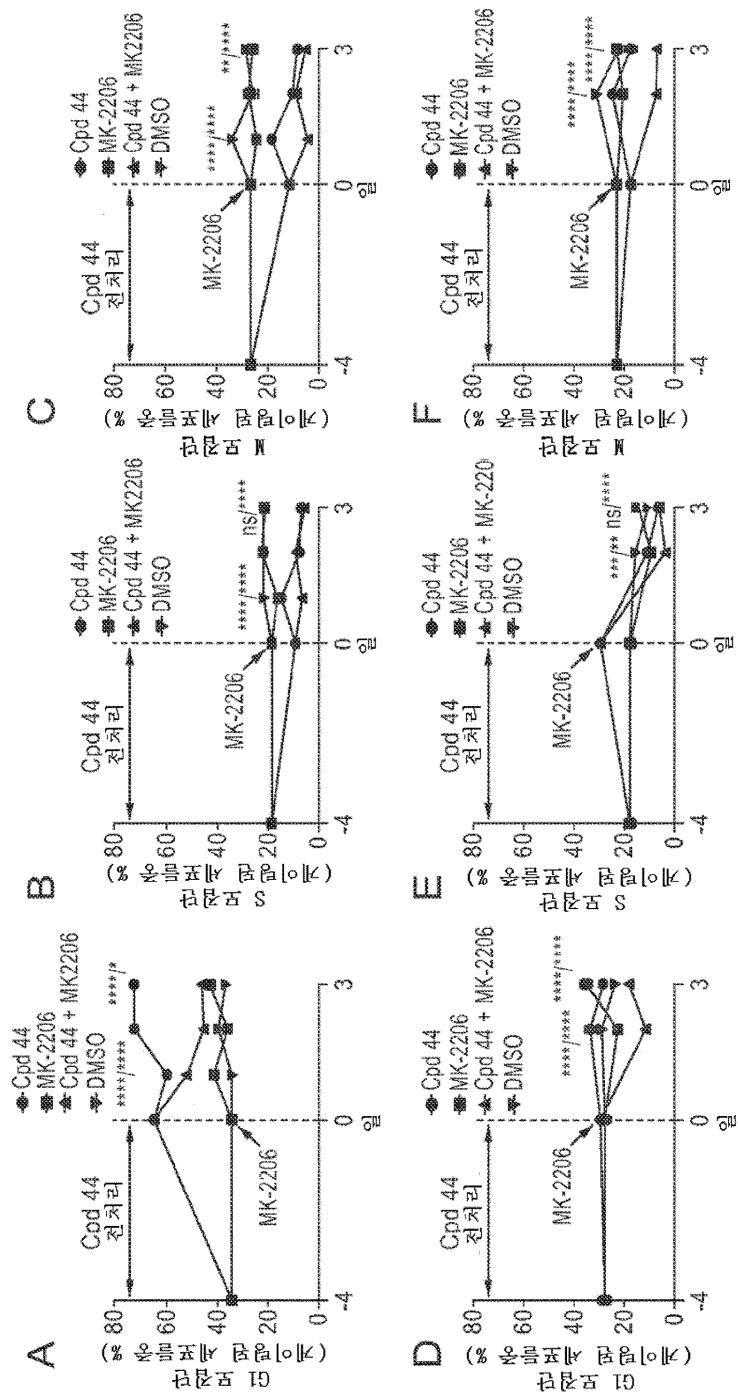
도면 16



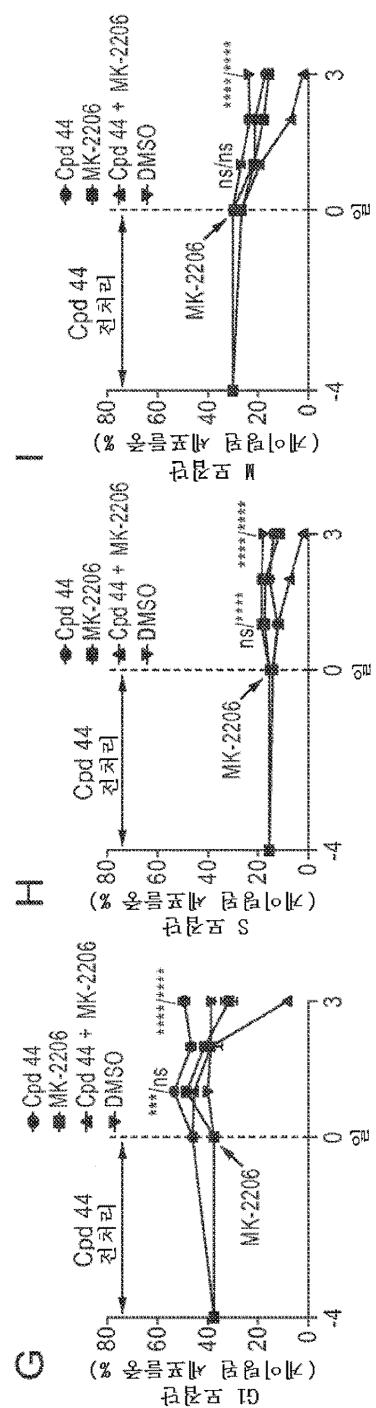
도면17



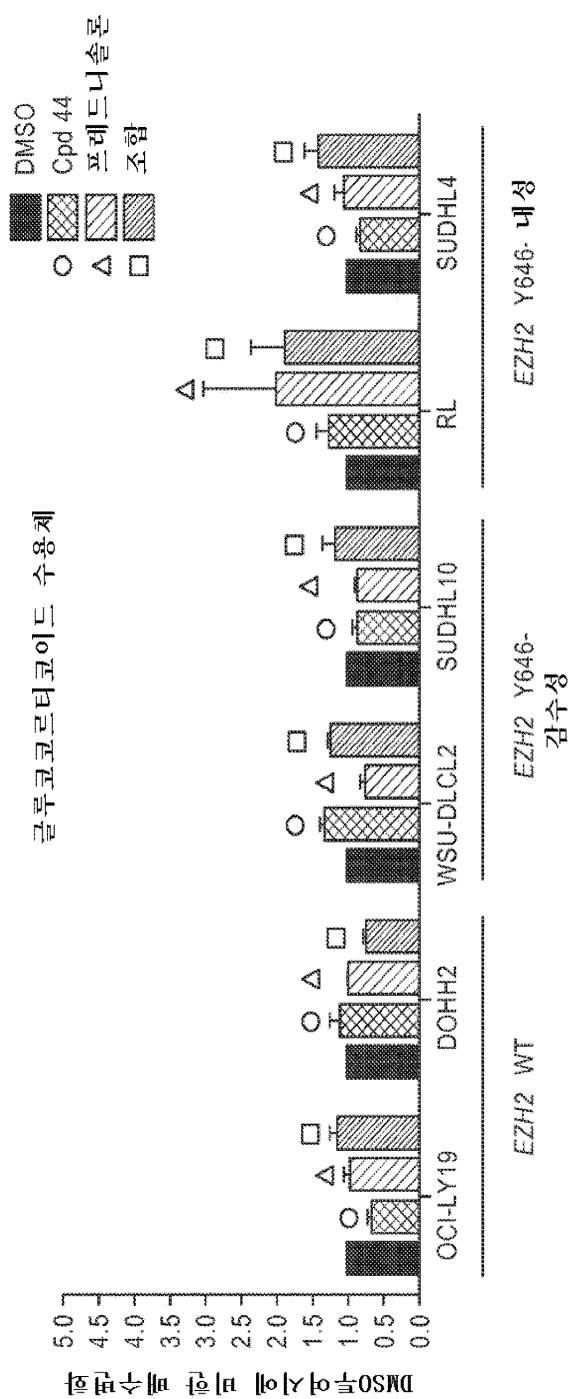
도면 18a



도면 18b



도면 19



도면20

