



(21) 申請案號：111143736

(22) 申請日：中華民國 111 (2022) 年 11 月 16 日

(51) Int. Cl. : *C12Q1/6886 (2018.01)*

(30) 優先權：2021/11/23 義大利 102021000029558

(71) 申請人：義大利商義大利藥品股份有限公司 (義大利) ITALFARMACO S.P.A. (IT)
義大利

(72) 發明人：佛沙提 吉安路卡 FOSSATI, GIANLUCA (IT)；瑞帕蒙蒂 奇亞拉 RIPAMONTI,
CHIARA (IT)；史坦庫爾勒 克里斯丁 STEINKUEHLER, CHRISTIAN (DE)

(74) 代理人：王彥評

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：17 項 圖式數：26 共 83 頁

(54) 名稱

檢測 RNA 生物標記之方法

(57) 摘要

本發明係關於一種基於 mRNA 生物標記的方法，其可在受癌症影響之患者的臨床治療期間用於測定組蛋白去乙酰酶 6 (HDAC6) 抑制劑(諸如化合物 N-羥基-4-((5-(噻吩-2-基)-1H-四唑-1-基)甲基)苯甲醯胺)的有效劑量及/或生物活性。更具體而言，本發明涉及在評估 HDAC6 抑制劑(諸如化合物 N-羥基-4-((5-(噻吩-2-基)-1H-四唑-1-基)甲基)苯甲醯胺)臨床療效的方法中，分析在人類單核球中特定生物標記的基因表現的變化作為「基因表現印記」。

The present invention relates a method based on mRNA biomarkers that can be used to define the efficacious dose and/or the biological activity of inhibitors of histone deacetylase 6 (HDAC6), such as the compound N-hydroxy-4-((5-(thiophen-2-yl)-1 H-tetrazol-1 -yl)methyl) benzamide, during the clinical treatment of patients affected by cancer. More in particular, the invention refers to the analysis of the gene expression's variation of specific biomarkers in human monocytes, as "gene expression signatures", in a method to evaluate the clinical efficacy of HDAC6 inhibitors, such as the compound N-hydroxy-4-((5-(thiophen-2-yl)-1 H-tetrazol-1 -yl)methyl)benzamide.

【發明摘要】

【中文發明名稱】

檢測 RNA 生物標記之方法

【英文發明名稱】

METHOD TO DETECT RNA BIOMARKERS

【中文】

本發明係關於一種基於 mRNA 生物標記的方法，其可在受癌症影響之患者的臨床治療期間用於測定組蛋白去乙醯酶 6 (HDAC6) 抑制劑(諸如化合物 N-羥基-4-((5-(噻吩-2-基)-1H-四唑-1-基)甲基)苯甲醯胺)的有效劑量及/或生物活性。更具體而言，本發明涉及在評估 HDAC6 抑制劑(諸如化合物 N-羥基-4-((5-(噻吩-2-基)-1H-四唑-1-基)甲基)苯甲醯胺)臨床療效的方法中，分析在人類單核球中特定生物標記的基因表現的變化作為「基因表現印記」。

【 英文 】

The present invention relates a method based on mRNA biomarkers that can be used to define the efficacious dose and/or the biological activity of inhibitors of histone deacetylase 6 (HDAC6), such as the compound N-hydroxy-4-((5-(thiophen-2-yl)-1 H-tetrazol-1 -yl)methyl) benzamide, during the clinical treatment of patients affected by cancer. More in particular, the invention refers to the analysis of the gene expression's variation of specific biomarkers in human monocytes, as "gene expression signatures", in a method to evaluate the clinical efficacy of HDAC6 inhibitors, such as the compound N-hydroxy-4-((5-(thiophen-2-yl)-1 H-tetrazol-1 -yl)methyl)benzamide.

【 指定代表圖 】

無。

【 代表圖之符號簡單說明 】

無。

【 特徵化學式 】

無。

【發明說明書】

【中文發明名稱】

檢測 RNA 生物標記之方法

【英文發明名稱】

METHOD TO DETECT RNA BIOMARKERS

【技術領域】

【0001】本發明係關於檢測 RNA 生物標記之方法。

【先前技術】

【0002】真核細胞的遺傳物質被組織成一個由 DNA 及蛋白質組成的複雜且動態的結構，稱為染色質。染色質的主要蛋白質成分為組蛋白，其為與 DNA 相互作用形成染色質之結構單元的鹼性蛋白質，該染色質之結構單元係核小體，為核內染色體緊縮的第一級。鹼性組蛋白殘基與 DNA 的酸性磷酸酯主鏈之間的相互作用對於確定核小體緊縮及調節複製及轉錄的分子複合物的可近性至關重要。此相互作用主要受核心組蛋白 N 端序列的多種轉譯後修飾的影響，諸如甲基化、磷酸化、泛蛋白化及乙醯化。組蛋白 N 端離胺酸殘基的去乙醯化可使胺基質子化，胺基藉由帶有正電荷而與 DNA 中所含的負電荷相互作用。此類相互作用導致染色質更緊密的狀態，從而導致基因表現的緘默化。

【0003】相反地，相同殘基的乙醯化會阻止離子鍵的形成，導致染色質較不緊密的形式，從而允許更多的 DNA 暴露以及與活化基因轉錄的大分子複合物的相互作用。

【0004】除了這些物理化學後果外，轉譯後修飾的殘基亦被含有「閱讀器」蛋白(「reader」 protein)的布羅莫結構域(bromodomain)或克羅莫結構域(chromodomain)特異性地辨識，該閱讀器蛋白辨識甲基化或乙醯化標記並參與被壓抑或活化的染色質狀態的穩定化。

【0005】組蛋白乙醯化程度受兩類酶的活性平衡所調節：組蛋白乙醯基轉移酶(histone acetyl transferase, HAT)及組蛋白去乙醯酶(histone deacetylase, HDAC)。此精細的平衡的改變會導致細胞內環境恆定的喪失，這在各種人類疾病中很常見，包括癌症、神經疾病、炎症及自體免疫疾病。

【0006】組蛋白去乙醯酶係因為其催化組蛋白 N 端離胺酸殘基的胺基的去乙醯化而被如此分類。此對於組蛋白尾部離胺酸的酶活性進一步將它們分類為「抹除器(eraser)」，而與被稱為「寫入器(writer)」的 HAT 酶相反。隨後，發現這些酶有大量的受質，因為它們的活性亦運用於含有 N-乙醯基-離胺酸之 HAT 酶的非組蛋白蛋白質受質。這些受質包括轉錄因子、DNA 修復酶及許多其他核蛋白及細胞質蛋白。

【0007】人類 HDAC 家族由 18 種酶組成，分為兩群組：鋅依賴性 HDAC 及 NAD 依賴性 HDAC，亦稱為 sirtuin(第 III 類)。鋅依賴性 HDAC 進一步分為四類：1) 第 I 類，包括 HDAC1、2、3 及 8，主要位於細胞核中的普遍存在的同工酶；2) 第 IIa 類，包括 HDAC4、5、7 及

9，位於細胞核及細胞質中的同工酶；3)第 IIb 類，包括 HDAC6 及 HDAC10，主要位於細胞質中；及 4)第 IV 類，僅包括 HDAC11。與第 I 類 HDAC 不同，第 IIa 類及某種程度上的第 IIb 類具有組織特異性表現。

【0008】藉由調節基因表現並作用於組蛋白及轉錄因子，很明顯地這些酶參與了無數的細胞功能。此外，藉由作用於許多蛋白質受質，這些酶參與許多其他過程，例如訊息轉導及細胞骨架重排。

【0009】在過去的 20 年裡，已開發出幾種 HDAC 抑制劑，並有 5 種分子已被批准用於治療人類癌症(伏立諾他 (Vorinostat)、羅米地辛 (Romidepsin)、貝利司他 (Belinostat)、帕比司他 (Panobinostat) 及西達本胺 (Chidamide))。所有這些分子皆會抑制在正常組織中亦會起作用的多種 HDAC 亞型。因此，它們的治療潛力受到諸如血小板減少症、胃腸道毒性或疲勞等毒性的限制。

【0010】因此，科學界的注意力集中在針對個別 HDAC 同功型之選擇性抑制劑的合成及研究上，意圖開發具有更好藥理能力的分子。

【0011】針對特定 HDAC 同功型(尤其是 HDAC6)的選擇性抑制劑可能特別有用於治療與增殖性疾病及蛋白質蓄積、免疫系統疾病、呼吸道疾病、神經疾病及神經退化性疾病(例如中風、杭丁頓氏舞蹈症 (Huntington's disease)、ALS 及阿滋海默氏症 (Alzheimer's disease)) 相關的病症。HDAC6 係鋅依賴性組蛋白去乙醯酶家族的

成員，具有一些獨特及有區別的特徵，諸如存在兩個具有不同催化活性及可能具有不同生物學作用的活性位。HDAC6 受質包括 α -微管蛋白、Hsp90 (熱休克蛋白 90)、皮層蛋白 (cortactin)、 β -鏈蛋白 (β -catenin)。

【0012】HDAC6 對這些蛋白質乙醯化狀態的調節與幾個重要過程相關，諸如免疫反應 (Wang et al., Nat. Rev. Drug Disc. (2009), 8(12), 969-981; Kalin JH et al. J. Med. Chem. (2012), 55, 639-651; de Zoeten EF et al. Mol. Cell. Biol. (2011), 31(10), 2066-2078); 微管動力學的調節，包括細胞遷移及細胞間相互作用 (Aldana-Masangkay et al., J. Biomed. Biotechnol. (2011), ID 875824); 及錯誤摺疊蛋白質的降解。HDAC6 在大多數身體組織中持續性地表現，並具有普遍的細胞溶質定位，儘管它亦在核區室中發揮活性。HDAC6 活性在諸如癌症、神經病變、呼吸道疾病及自體免疫病症等病症中發生改變 (Li, T., Zhang, C., Hassan, S., Liu, X., Song, F., Chen, K., Zhang, W., and Yang, J. (2018). Histone deacetylase 6 in cancer. Journal of Hematology & Oncology 11, 111); Prior, R., Van Helleputte, L., Klingl, Y.E., and Van Den Bosch, L. (2018). HDAC6 as a potential therapeutic target for peripheral nerve disorders. Expert Opinion on Therapeutic Targets 22, 993-1007)。

【0013】在癌症的背景下，HDAC6 已被認為是腫瘤微環境功能的關鍵調節劑，其藉由調節免疫細胞及腫瘤細胞中 PD-L1 的表現來控制抗腫瘤免疫反應。HDAC6 亦

參與調節致癌蛋白的表現，尤其是在血液腫瘤中，諸如各種類型的白血病(Fiskus et al., Blood (2008), 112(7), 2896-2905; Rodriguez-Gonzales, Blood (2008), 112(11), abstract 1923)及多發性骨髓瘤(Hideshima et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2005), 102(24), 8567-8572)。HDAC6 對 α -微管蛋白乙醯化的調節可能與轉移的發生有關，其中細胞運動扮演重要角色(Sakamoto et al., J. Biomed. Biotechnol. (2011), 875824)。

【0014】此外，與具有劑量限制性毒性的非選擇性 HDAC 抑制劑的臨床前及臨床觀察形成鮮明對比的是，HDAC6 抑制劑沒有顯示任何明顯的毒性徵象。而且，HDAC6 剔除小鼠可存活，發育正常，沒有明顯的病理改變徵象。這與去除其他 HDAC 亞型表現時觀察到的情況形成對比。

【0015】總之，HDAC6 的選擇性抑制劑有望在耐受性良好的同時具有相當大的治療潛力。

【0016】在 WO2018/189340 中，我們揭露一種特別有效的 HDAC6 抑制劑，N-羥基-4-((5-(噻吩-2-基)-1H-四唑-1-基)甲基)苯甲醯胺，已發現其在調節抗腫瘤免疫反應中具有突出的活性。與 HDAC6 抑制劑已知的優異耐受性一致，此分子在大鼠、小鼠及犬中具有良好的耐受性(1000 mg/kg)，暗示它在人類中亦具有良好的耐受性。

【0017】使用 HDAC6 抑制劑瑞科諾他(Ricolinostat)及 KA2507 獲得的臨床數據進一步支持此一假設，這些

數據顯示在患者中非常良好的耐受性 (Amengual JE et al. *Oncologist* (2021) 3:184-e366 ; Tsimberidou AM et al. *Clin Cancer Res* (2021) 27:3584-3594)。

【0018】雖然對藥物而言是非常理想的，但沒有毒性副作用對其臨床開發提出了挑戰。

【0019】傳統上，腫瘤學第一期臨床試驗計畫書 (clinical protocol) 會計劃劑量遞增直至最大耐受劑量。通常在此劑量水準上擴大同屬性群，且推薦的第二期劑量源自耐受性、PK 及初步療效徵象的訊息。在沒有任何毒性副作用的情況下，需要使用其他參數來定義劑量。

【0020】生物標記對於確定生物有效劑量非常有幫助。

【0021】US2012/176076 揭露一種用於在患有多發性骨髓瘤的受試者中確定組蛋白去乙酰酶 6 抑制劑 (HDAC6) 之治療功效的套組，該套組包含特異性地結合選自 miRNA (SEQ ID N. 1-23)、mRNA (SEQ ID N. 24-25) 及小的非編碼 RNA (SEQ ID N. 26-27) 之 HDAC6 生物標記 RNA 的檢測劑。編碼蛋白質的 mRNA 序列只有 SEQ ID N. 24，其對應於智人缺氧誘導因子 1 (hypoxia inducible factor 1) 次單元 α (*HIF1A*)，轉錄變異體 2 mRNA；及 SEQ ID N. 25，其對應於智人蛋白質酪胺酸磷酸酶受體 U 型 (protein tyrosine phosphatase receptor type U) (*PTPRU*)，轉錄變異體 2 mRNA。

【0022】對於 HDAC6 抑制劑，微管蛋白乙醯化程度的增加可用作示值讀數 (readout)。例如，接受一劑量之 HDAC6 抑制劑的患者將在投予藥物後的不同時間點進行抽血，並可使用西方印漬分析測定在 PBMC 中的乙醯微管蛋白。雖然相對簡單，但此方法係定性或半定量的，並測量與抗腫瘤活性沒有直接關係的藥效性標記。

【0023】因此，需要一種基於患者樣品中可評估的生物學標記的定量方法，該方法可用於評估 HDAC6 抑制劑的藥理活性劑量，尤其是評估化合物 N-羥基-4-((5-(噁吩-2-基)-1H-四唑-1-基)甲基)苯甲醯胺的藥理活性劑量。

【發明內容】

【0024】我們驚奇地發現，我們的選擇性 HDAC6 抑制劑 N-羥基-4-((5-(噁吩-2-基)-1H-四唑-1-基)甲基)苯甲醯胺 (亦稱為 ITF3756) 可在經促發炎刺激 (pro-inflammatory stimuli) 活化的骨髓細胞中調升及/或調降不同基因的表現，且其可對未刺激及經 TNF- α 處理的人類單核球的基因表現產生更廣泛的影響。

【0025】特別是，已觀察到以 TNF- α 刺激的人類單核球強烈調升 PD-L1 基因，且 PD-L1 的表面表現及這些調升被 ITF3756 抑制。

【0026】此外，在實驗部分所報告的活體外數據證實，以 ITF3756 處理人類單核球調升 NBEAL2、FATP1/SCL27A1、LTBP4、CD40、ANXA6 及 IRF6 基因的表現以及調降 CD84、CD276、RANK/TNFRSF11a、

CXCL2 、 CXCL3 、 CD163 、 CD204/MSR1 、 CD206/MRC1、 ADA、 MMP9 及 STAB1 基因的表現。

【0027】因此，發明人獲得的結果導致鑑定出一組基因，亦稱為「基因表現印記」，其可被 HDAC6 抑制劑直接調節，更具體而言可被分子 ITF3756 調節，並可用作對此類分子的臨床開發至關重要的基因表現印記。

【0028】此外，該數據亦已從活體內獲得的實驗數據得到證實，其中觀察到在攜帶 CT26 的動物中，MMP9 基因顯著調降，IRF6 及 CD40 基因調升，這與 ITF3656 治療組的有反應的動物相關，證實該基因的表現程度與 HDAC6 的抑制劑在治療動物中的作用密切相關。

【0029】因此，本發明的一個具體實施例係用於評估 HDAC6 抑制劑的有效劑量及/或生物活性的方法，包含以下步驟：

- a) 確定在生物樣品中的至少一種由 HDAC6 抑制劑調節並選自 CD84、RANK/TNFRSF11a、CXCL3、CXCL2、STAB1、CD163、CD204/MSR1、CD206/MRC1、MMP9、NBEAL2、LTBP4、ANXA6、FATP1/SLC27a1、ADA、CD276、CD40 或 IRF6 基因的 RNA 生物標記的表現程度；
- b) 比較該表現程度與參考樣品的表現程度。

【0030】根據較佳的具體實施例，該方法在受癌症影響的患者的臨床治療期間評估 HDAC6 抑制劑之有效劑量及/或生物活性。

【0031】在進一步較佳的具體實施例中，該方法在受癌症影響的患者的臨床治療後評估 HDAC6 抑制劑之有效劑量及/或生物活性。此可用於評估治療後患者的狀況。

【0032】根據進一步較佳的具體實施例，該方法為活體外或離體的方法。

【0033】較佳地，該參考樣品來自未以 HDAC 抑制劑治療的健康受試者檢體、來自未以 HDAC 抑制劑治療的受癌症影響的受試者或來自開始 (t=0) 以 HDAC 抑制劑治療的受試者。

【0034】根據較佳的具體實施例，該 HDAC 抑制劑係選自突巴辛 (tubacin)、突巴司汀 (tubastatin)、聶圖司他 (nexturastat)、ACY-1215、ACY-738、ACY-1083、KA2507、T518、SW100 或 N-羥基-4-((5-(噻吩-2-基)-1H-四唑-1-基)甲基)苯甲醯胺 (ITF3756)，較佳地，該 HDAC 抑制劑為化合物 N-羥基-4-((5-(噻吩-2-基)-1H-四唑-1-基)甲基)苯甲醯胺。

【0035】根據較佳的具體實施例，本發明之方法進一步包含步驟 c) 將受試者分類為對臨床治療有反應或無反應。

【0036】較佳地，基於至少一種 RNA 生物標記的表現值是高於或是低於表現閾值，將受癌症影響的患者分類為對臨床治療有反應或無反應。

【0037】在一例示的具體實施例中，樣品表現值大於表現閾值表明患者將對抗癌治療有反應。在另一例示

的具體實施例中，樣品表現值低於表現閾值表明患者將對抗癌治療無反應。

【0038】在另一例示的具體實施例中，樣品表現值大於表現閾值表明患者將對抗癌治療無反應。在另一例示的具體實施例中，樣品表現值低於表現閾值表明患者將對抗癌治療有反應。

【0039】例如在實施例中證實，MMP9 的調降以及 IRF6 及 CD40 的調升與有反應的動物相關。

【0040】在進一步例示的具體實施例中，樣品表現值低於表現閾值表明患者患有癌症類型，或處於癌症類型的發展風險中，或對 HDAC6 抑制劑無反應。在另一例示的具體實施例中，樣品表現值高於表現閾值表明患者患有癌症類型，或處於癌症類型的發展風險中，或對 HDAC6 抑制劑有反應。在另一例示的具體實施例中，樣品表現分數高於閾值分數表明患者的癌症亞型具有良好的臨床預後。在另一例示的具體實施例中，樣品表現分數低於閾值分數表明患者的癌症亞型具有不佳的臨床預後。

【0041】根據進一步較佳的具體實施例，在本發明之方法中，生物標記 NBEAL2、LTBP4、ANXA6、FATP1/SCL27a1、CD40 或 IRF6 的表現程度被 HDAC6 抑制劑調升，且 RNA 生物標記 CD84、RANK/TNFRSF11a、CXCL3、CXCL2、STAB1、CD163、CD204/MSR1、CD206/MRC1、ADA、CD276 或 MMP9 的表現程度被 HDAC6 抑制劑調降。

【0042】根據較佳的具體實施例，在本發明之方法中，至少評估 RNA 生物標記 STAB1、CD84、CD206/MRC1、MMP9、CD163、CD40 及 IRF6 的表現程度，較佳地，至少評估 RNA 生物標記 MMP9、CD40 及 IRF6 的表現程度。

【0043】根據進一步較佳的具體實施例，該癌症係選自腎上腺皮質癌、肛門癌、星狀細胞瘤 (Astrocytomas)、皮膚基底細胞癌、膀胱癌、腦腫瘤、乳癌、不明原發性癌、心臟腫瘤、子宮頸癌、膽管癌、大腸直腸癌、子宮內膜癌、食道癌、眼內黑色素瘤、輸卵管癌、膽囊癌、胃癌、胃腸道類癌瘤、胃腸道間質瘤 (GIST)、生殖細胞腫瘤、睪丸癌、頭頸癌、肝細胞癌、胰島細胞瘤、胰臟神經內分泌腫瘤、蘭格漢氏細胞 (Langerhans Cell) 組織球增多症、白血病、肺癌 (非小細胞、小細胞、胸膜肺母細胞瘤及氣管支氣管腫瘤)、黑色素瘤、梅氏細胞 (Merkel Cell) 癌、間皮瘤、伴隨 NUT 基因改變的中線道癌 (Midline Tract Carcinoma)、多發性內分泌腫瘤症候群、多發性骨髓瘤/漿細胞腫瘤、骨髓化生不良症候群、骨髓化生不良/骨髓增生性腫瘤、神經母細胞瘤、卵巢癌、胰臟癌、副神經節瘤、副甲狀腺癌、陰莖癌、嗜鉻細胞瘤、腦下垂體瘤、原發性腹膜癌、前列腺癌、腎細胞癌、視網膜母細胞瘤、肉瘤、皮膚鱗狀細胞癌、胸腺瘤及胸腺癌、甲狀腺癌、腎盂及輸尿管移行細胞癌、子宮癌、陰道癌、血管瘤、陰門癌以及威爾姆斯氏瘤 (Wilms Tumor)。

【0044】較佳地，該癌症係選自黑色素瘤、腎細胞癌、非小細胞肺癌及大腸直腸癌。

【0045】較佳地，生物樣品為組織樣品或體液，較佳地，該組織樣品為腫瘤生檢或血液細胞；較佳地，該體液為血液、血清或血漿。

【0046】更佳地，該血液細胞為單核球或周邊血液單核細胞(PBMC)。

【0047】根據本發明，該單核球可從受癌症影響的患者單離或藉由活體外培養盤單離，其中單核球的細胞培養物已用 HDAC6 抑制劑處理。

【0048】根據較佳的具體實施例，生物標記為 RNA 轉錄本。如本文所使用，「RNA 轉錄本」係指編碼及非編碼 RNA，包括傳訊 RNA (mRNA)、選擇性剪接 mRNA、核糖體 RNA (rRNA)、轉送 RNA (tRNA)、核小 RNA (snRNA) 及反義 RNA。測量生物樣品中的 mRNA 可用作檢測生物樣品中對應蛋白質及基因的水準的替代物。因此，亦可藉由檢測適當的 RNA 來檢測本文所述之任何生物標記或生物標記組。

【0049】根據較佳的具體實施例，步驟 a) 中生物標記的表現程度係藉由 RNA 定序、定量 RT-PCR (qRT-PCR)、數位 PCR、Affymetrix 微陣列、定制微陣列或 NanoString 技術而檢測。

【0050】生物標記表現譜的方法包括但不限於定量 PCR、NGS、北方印漬術、南方印漬術、微陣列、SAGE 或可測量特定生物標記的 RNA、mRNA 或蛋白質水準的其他技術。

【0051】可使用本技術領域中具通常知識者已知的方法對給定樣品的整體表現數據進行標準化，以針對不同量的起始材料、不同的萃取及擴增反應效率進行校正。

【0052】根據較佳的具體實施例，本發明方法的步驟 a)由以下子步驟構成：

- (i) 單離 PBMC 及/或單核球；
- (ii) 萃取 RNA 樣品；
- (iii) 定量至少一種選自以下的 RNA 生物標記：CD84、RANK/TNFRSF11a、CXCL3、CXCL2、STAB1、CD163、CD204/MSR1、CD40、CD206/MCR1、MMP9、NBEAL2、LTBP4、ANXA6、FATP1/SLC27a1、ADA、CD276 及 IRF6 基因；
- (iv) 藉由對所定量的 RNA 生物標記進行生物資訊學分析來評估不同表現的生物標記；
- (v) 將從 (iv) 點獲得的結果與有反應或無反應的患者相關聯。

【0053】本發明另一具體實施例為用於評估 HDAC6 抑制劑之有效劑量及/或生物活性的套組，其包含多孔盤及用於測定要被檢測的各 RNA 生物標記之表現程度的合適引子及/或探針。

【0054】較佳地，該 RNA 生物標記係選自 CD84、RANK/TNFRSF11a、CXCL3、CXCL2、STAB1、CD163、CD204/MSR1、CD40、CD206/MCR1、MMP9、NBEAL2、LTBP4、ANXA6、FATP1/SLC27a1、ADA、CD276 及 IRF6 基因。

【 0055 】 進一步較佳的具體實施例為用於評估 HDCA6 抑制劑之有效劑量及/或生物活性的套組，其包含多孔盤及用於測定選自以下至少一種 RNA 生物標記之表現程度的合適引子及/或探針： CD84、RANK/TNFRSF11a、CXCL3、CXCL2、STAB1、CD163、CD204/MSR1、CD40、CD206/MCR1、MMP9、NBEAL2、LTBP4、ANXA6、FATP1/SLC27a1、ADA、CD276 及 IRF6 基因。

[定義]

【 0056 】 除非另外定義，否則本文使用的所有技術術語、符號及其它科學術語皆意圖具有本揭示所屬技術領域中具通常知識者通常理解的含義。於一些情形，為了清楚及/或為了便於參考而在本文中定義具有通常理解的含義的術語；因此，本文之此種定義所包括者不應被解釋為表示與本技術領域中一般被理解者的實質差異。

【 0057 】 術語「包含」、「具有」、「包括」及「含有」應被理解為開放式用語(意指「包括但不限於」)，且亦應被視為對諸如「實質上由...組成(essentially consist of、essentially consisting of)」、「由...組成(consist of、consisting of)」等術語的支持。

【 0058 】 術語「實質上由...組成」應被理解為半封閉式用語，意指包括不影響本發明的新穎特徵的其它成分(因此可包括選擇性的賦形劑)。

【 0059 】 術語「由...組成」應被理解為封閉式用語。

【0060】本文中的術語「基因表現印記」係指源自用作生物標記的數種 mRNA 或 RNA(即轉錄本)的組合的表現模式。

【0061】根據本發明，術語「RNA 生物標記的表現程度」係指測定及/或定量特定基因(生物標記)的 RNA 或 mRNA，諸如測定及/或定量與對照相比之 RNA 或 mRNA 的過度表現或表現不足；測定樣品中是否存在 RNA 或 mRNA；測定 RNA 的序列；測定 RNA 的任何修飾、或測定 RNA 的任何突變或變異。可測定 RNA 水準是存在或不存在，高於或低於對照，或給定 RNA 量的數值，諸如每微升的 RNA 拷貝數。RNA 的表現程度可藉由絕對或相對定量來定量。絕對定量可藉由包括已知濃度的一種或多種目標核酸並參考未知物與已知目標核酸的雜交強度來達成(例如，通過生成標準曲線)。或者，相對定量可藉由比較兩個或多個基因之間的雜交訊號或處理/未處理之間的雜交訊號來達成，以定量雜交強度的變化，並暗示著定量轉錄程度的變化。

【0062】本文中的術語「生物標記」(生物學標記的縮寫)係指生物學指標(例如轉錄本，即 mRNA)及/或一些生物學狀態或條件的量度。

【0063】根據本發明，當與未接觸治療劑之情況下的生長相比，若腫瘤大小或癌症的生長速率由於接觸治療劑而受到抑制，則受癌症影響的患者對治療劑是「有反應的」。可以多種方式測量癌症的生長。例如，腫瘤的大小或測量適合該腫瘤類型的腫瘤標記的表現。

【0064】當與未接觸治療劑之情況下的生長相比，若腫瘤大小或癌症的生長速率並未由於接觸治療劑而受到抑制或抑制程度很低，則受癌症影響的患者對治療劑是「無反應的」。如上所述，可以多種方式測量癌症的生長，例如，腫瘤的大小或測量適合該腫瘤類型的腫瘤標記的表現。

【0065】對治療劑無反應的特徵是高度可變的，不同的癌症在不同的條件下對給定的治療劑呈現出不同程度的「無反應性」。更進一步地，無反應性的量度可使用除了腫瘤生長大小之外的額外標準評估，例如但不限於患者生活品質及轉移程度。

【0066】根據本發明，術語「調升」、「調升的」、「過度表現」及其任何變化可互換使用，係指生物樣品中生物標記的值或水準大於通常在來自健康或正常個體的類似生物樣品中所檢測到的生物標記之值或水準(或者值或水準的範圍)。該術語亦指生物樣品中生物標記的值或水準大於可在特定疾病的不同階段檢測到的生物標記的值或水準(或者值或水準的範圍)。

【0067】根據本發明，術語「調降」、「調降的」、「表現不足」及其任何變化可互換使用，係指生物樣品中生物標記的值或水準小於通常在來自健康或正常個體的類似生物樣品中所檢測到的生物標記之值或水準(或者值或水準的範圍)。該術語亦指生物樣品中生物標記的值或水準小於可在特定疾病的不同階段檢測到的生物標記的值或水準(或者值或水準的範圍)。

【0068】此外，與表明或象徵個體正常過程或者不存在疾病或其他病況的生物標記的「正常」表現程度或值相比，過度表現或表現不足的生物標記亦可稱為「差異表現」或具有「差異程度」或「差異值」。因此，生物標記的「差異表現」亦可指生物標記之從「正常」表現程度的變化。

【0069】根據本發明，術語 HDAC6 抑制劑的「生物活性」係指本發明所述之任何基因的表現的調節/變化。

【0070】根據本發明，術語「有效劑量」係指可被認為有效治療患者癌症的 HDAC6 抑制劑的劑量。

【圖式簡單說明】

【0071】

圖 1.藉由 RNA 定序(RNAseq)獲得基因表現數據所進行的實驗程序流程圖。

圖 2.樣品與樣品間距離分析(2A)及主成分分析(2B)。

圖 3A 及圖 3B.顯示藉由特定處理而選擇性地或普遍地調升的基因數量之文氏圖(Venn diagram)。由 Oliveros, J.C. (2007-2015) Venny 的工具生成，此為一種用於將列表與文氏圖進行比較的交互式工具。
<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>。

圖 4.純化的人類單核球依指示進行處理，並從 RNAseq 數據分析 CD274/PD-L1 的表現。

圖 5A、圖 5B 及圖 5C.人類單核球在 ITF3756 處理後調降 CD84 的表現(A)。CD84 示意結構(B)及免疫細胞表現(C)。

圖 6.ITF3756 誘導 RANK/TNFRSF11a 的強烈調降，其程度與 TNF- α 相似。

圖 7A 及圖 7B.ITF3756 降低人類單核球中 CXCL2 (A)及 CXCL3 (B)的表現。

圖 8.ITF3756 單獨及與 TNF- α 組合強烈調降 STAB1 基因的表現。

圖 9.ITF3756 單獨及與 TNF- α 組合增加 NBEAL2 的表現。

圖 10.ITF3756 調升 LTBP4 的表現。

圖 11. 顯示在人類單核球中 ITF3756 對 FATP1/SLC27A1 表現的影響與 ITF3756 及 TNF- α 對 FATP1/SLC27A1 表現的相反影響。

圖 12.顯示僅 ITF3756 誘導 IRF6 表現的調節，而 TNF- α 或組合並無效果。

圖 13.ITF3756 單獨調升 ANXA6 基因表現，並在 TNF- α 存在下以明顯協同的方式調升。

圖 14.ITF3756 調升 CD40 基因表現，且當與 TNF- α 組合時，會略微增加由 TNF- α 單獨誘導的 CD40 表現的調升。

圖 15.M2 巨噬細胞標記 CD163 被 ITF3756 單獨及在 TNF- α 存在下調降。

圖 16.M2 巨噬細胞標記 CD204/MSR1 被 ITF3756 單獨調降並被 ITF3756 在 TNF- α 存在下強烈調降。

圖 17.M2 巨噬細胞標記 CD206/MRC1 被 ITF3756 單獨及在 TNF- α 存在下強烈調降。

圖 18.M2 巨噬細胞標記 MMP9 被 ITF3756 調降。當以 TNF- α 或 ITF3756 + TNF- α 處理細胞時，與未處理的對照相比並沒有觀察到調節。

圖 19.M2 巨噬細胞標記 ADA 被 ITF3756 調降。TNF- α 及組合誘導 ADA 基因表現的調升。

圖 20A 及圖 20B.顯示 STAB1 及 IRF6 基因在以 1 μ M ITF3756 處理的 PBMC 中的調節。A. STAB1 之調降。B. IRF6 之調升。

圖 21A 及圖 21B.顯示 ITF3756 活體內誘導持續的微管蛋白乙醯化。A.顯示乙醯微管蛋白及微管蛋白帶 (band) 的西方印漬。B.定量帶強度以計算標準化為總微管蛋白含量之微管蛋白乙醯化的倍數增加量。

圖 22A、B、C、D 及 E.荷瘤動物 (tumor bearing animal) 對 ITF3756 治療的不同反應。以 ITF3756 治療的動物可分為三個不同的組別。A. ITF3756 組與媒劑組比較 (腫瘤體積的平均值 \pm SEM)。圖 B、C、D 及 E 說明所示之四個組別中單一動物在研究期間的腫瘤體積變化。

圖 23A、B、C、D 及 E.荷瘤動物對抗 PD-1 治療的不同反應。以抗 PD-1 治療的動物可分為三個不同的組別。A.抗 PD-1 組與媒劑組及同型對照組比較 (腫瘤體積的平均值 \pm SEM)。圖 B、C、D、E 說明所示之四個組別中單一動物在研究期間的腫瘤體積變化。

圖 24A、B 及 C.在腫瘤微環境中 MMP9 調降與有反應的小鼠相關。與無反應者相比，以 ITF3756 治療的攜帶 CT26 的小鼠具有統計學上顯著降低的 MMP9 表現 (B)。若考量所有動物 (A)或考量抗 PD-1 治療的動物 (C)，則不存在此種相關性。

圖 25A、B 及 C.在腫瘤微環境中 IRF6 調升與有反應的小鼠相關。與無反應者相比，以 ITF3756 治療之有反應的小鼠的 IRF6 表現顯著調升 (B)。若考量所有動物 (A)或考量抗 PD-1 治療的動物 (C)，則不存在此種相關性。

圖 26A、B 及 C.在腫瘤微環境中 CD40 調升與有反應的小鼠相關。與無反應者相比，以 ITF3756 治療之有反應的小鼠具有統計學上顯著調升的 CD40 表現 (B)。若考量所有動物 (A)或考量抗 PD-1 治療的動物 (C)，則不存在此種相關性。

【實施方式】

實施例

材料與方法

單核球純化及 TNF- α 活化

【0072】通過 Ficoll-Hypaque 梯度 (Biochrom) 分離健康供體的膚色血球層 (Buffy Coat) (根據輸血的要求，所有樣品的傳染性疾病檢測呈陰性) 而獲得用於實驗的 PBMC。

【0073】依據製造商的說明，使用泛單核球 (Pan Monocytes) 單離套組 (Milteny)，藉由陰性選擇從

100x10⁶ PBMC 中純化單核球。藉由泛單核球單離套組，將未接觸的單核球從人類 PBMC 中單離出來，並達到同時富集典型 (CD14⁺⁺CD16⁻)、非典型 (CD14⁺CD16⁺⁺) 及中間型 (CD14⁺⁺CD16⁺) 單核球。非單核球，諸如 T 細胞、NK 細胞、B 細胞、樹突細胞及嗜鹼性球，係使用結合有生物素的抗體的混合物及抗生物素微珠進行間接磁性標識。簡而言之，將 400 μL 緩衝液 (PBS 1X、0.5% BSA 及 2mM EDTA)、100 μL FcR 阻斷試劑及 100 μL 生物素-抗體混合物 (Biotin-Antibody Cocktail) 添加至預先以 PBS 藉由 300xg 離心 5 分鐘洗滌之 PBMC，混合並在冰箱 (2-8 °C) 中培養 5 分鐘。培養後，將 300 μL 緩衝液及 200 μL 抗生物素微珠添加至細胞中，混合並在冰箱中進一步培養 10 分鐘。培養後，將細胞藉由隨後的磁性細胞分離進行處理。將細胞懸浮液施加至管柱上，並收集含有未標識細胞 (代表富集的單核球) 的順流液 (flow-through)。以緩衝液藉由 300xg 離心 5 分鐘洗滌純化的單核球，並在 PBS 中計數。純化的單核球 (1.0X10⁶/ml) 在 12 孔盤中的 1 ml 最終體積之完全培養基 (RPMI (Biochrom)、FCS 10% 及青黴素/鏈黴素 1x (Sigma)) 中，以 ITF3756 1 μM 或 DMSO (0.005%) 預處理 2 小時。然後使用或不使用 TNF-α (100 ng/mL, Peprotech) 刺激細胞 4 小時。與 ITF3756 及 TNF-α 培養後，收集細胞，以 PBS 藉由 300xg 離心 5 分鐘洗滌，-80 °C 保存。

【0074】樣品在工作台上解凍 2 分鐘，並依據製造商的說明以 Trizol 試劑 (Thermo Fisher Scientific) 萃取總

RNA。簡而言之，將 Trizol 試劑(每 $5-10 \times 10^6$ 個細胞 0.75ml Trizol)添加至樣品中，並將樣品在室溫(RT)下培養 5 分鐘。培養後，對樣品添加氯仿(每 0.75 mL Trizol 添加 150 μ L)，於室溫培養 3 分鐘後，將樣品在 4°C 以 12000xg 離心 14 分鐘。離心後，混合物分離成 3 相，RNA 保留在水相中。將每個樣品的水相移置於新試管中，並在每個試管中加入異丙醇(每 0.75ml Trizol 添加 0.375 ml)。樣品在冰箱(2-8°C)中培養 30 分鐘。培養後，將樣品在 4°C 下以 12000xg 離心 10 分鐘，移除上清液並對樣品添加 75% 乙醇(每 0.75ml Trizol 添加 0.75ml)。將樣品在 4°C 以 7500xg 離心 5 分鐘，並丟棄上清液。將 RNA 在工作台上風乾 5-10 分鐘。然後將 RNA 樣品再懸浮於水(10-50 μ L)中。

【 0075 】藉由使用 NanoDrop 1000 分光光度計(Thermo Scientific)測量 260 nm 處的吸光度來確定 RNA 濃度。藉由亦測量 280 處之吸光度，還可以估計 RNA 污染的程度。260 nm/280 nm 吸光度比可用於鑑定蛋白質污染。若 260 nm/280 nm 吸光度比約為 2，則認為樣品純度足夠。

【 0076 】使用配備 Agilent RNA 6000 Pico 套組(Agilent Technologies)的 Agilent 2100 Bioanalyzer 儀器(Agilent Technologies)，藉由毛細管電泳評估萃取的 RNA 完整性。該系統允許使用已知濃度的高純度 RNA 分子量標準液(ladder)作為參考來同時分析多達 12 個樣品。該步驟準則包括一個變性步驟，在 70°C 下對所有樣

品及 RNA 分子量標準液進行 2 分鐘；以及一個使用含有螢光嵌入劑 (fluorescent intercalator) 的運行凝膠製備晶片的步驟。RNA 分子結合嵌入分子，並藉由儀器檢測利用電泳分離的分子的螢光。

【0077】藉由將 550 μL RNA 凝膠基質移液至旋轉過濾 (由套組提供) 中來製備凝膠。在室溫下以 1500 $\times g$ 離心 10 分鐘後，製備過濾凝膠的 65 μL 等分試樣。將 RNA 染料濃縮物在室溫下平衡 30 分鐘，然後進行渦旋、離心沉澱並將 1 μL 染料添加至 65 μL 等分試樣的過濾凝膠中。混合凝膠-染料混合物並在室溫下以 13000 $\times g$ 離心 10 分鐘。將新的 RNA 晶片置於晶片起動注給站 (chip priming station) 上，並將 9 μL 凝膠-染料混合物移液至指定的孔中，並藉由柱塞分配至晶片中。在所有 11 個樣品孔及分子量標準液孔中添加 5 μL RNA 標記。然後，對晶片在分子量標準液孔中添加 1 μL 分子量標準液並在 11 個樣品孔的每個孔中添加 1 μL 樣品。將晶片以 2400 rpm 渦旋 1 分鐘，並在 5 分鐘內於 Agilent 2100 Bioanalyzer 儀器中運行。

【0078】該軟體允許藉由評估 RNA 數量指數 (RNA Quantity Index, RQI) 來基於演算法計算獲得每個樣品的純度估計值，該演算法根據 rRNA 28S/rRNA 18S 比率的函數為每個樣品分配 1 至 10 的值。若此指數大於或等於 7.5，則認為該樣品具有高純度。

RNAseq

【0079】為生成 RNA 序列數據而進行的實驗程序流程圖如圖 1 所示。

RNA 萃取

【0080】為確定 RNA 樣品的數量及完整性/純度，首先使用 RNA 6000 LabChip®套組 (Agilent#5067-1511)，藉由 Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer 進行檢查控制。Bioanalyzer 係一種生物分析裝置，它結合了微流體晶片、填充有凝膠的通道中之電壓誘導的尺寸分離及微型規模的雷射誘導的螢光 (LIF) 檢測。RNA Integrity Number (RIN) 軟體演算法允許基於從 1 到 10 的編號系統對總 RNA 進行分類 (1 為最降解的，10 為最完整的)。所有 RIN 低於 7.5 的樣品都被丟棄，而其他樣品則被處理用於庫 (library) 製備及定序。

PolyA mRNA 選擇

【0081】依據 TruSeq RNA 樣品製備手冊 (Illumina # 15015050) 中的建議，使用兩回合純化 (陽性選擇)，使用附著 poly-T 寡聚物的磁珠，從 200 ng 總 RNA 中單離出 mRNA。

庫製備及 cDNA 合成

【0082】使用 TruSeq RNA-Seq v2 庫製備套組處理純化的樣品。簡而言之，在 Illumina 專用的片段化緩衝液中，在高溫下使用二價陽離子進行化學片段化。使用隨機寡核苷酸及 SuperScript II (Invitrogen# 18064-014) 合成第一股 cDNA。隨後使用 DNA 聚合酶 I 及 RNase H 進

行第二股。在允許選擇片段大小的 Agencourt AMPure XP 珠純化(Beckman#A63882)後，經由核酸外切酶/聚合酶活性將突出端轉化為齊平端，然後移除酶。DNA 片段在其 3'端被腺苷酸化，然後在 PCR 反應中使用 Illumina PCR 引子混合物連接具索引的 Illumina TruSeq PE 轉接子(adapter)寡核苷酸、進行雙重純化及選擇性富集。

【 0083 】 PCR 庫產物以 AMPure XP 珠純化，在 Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer 上使用 Agilent DNA 1000 測定(Agilent#5067-1504)進行品質檢查，並使用 Qubit 2.0 螢光計與 dsDNA Broad Range Assay 套組(Thermo Fisher Scientific#Q32850)定量。將具索引的個別庫儲集以獲得各樣品的等莫耳濃度，然後進行處理以生成群集。

定序

【 0084 】 使用 cBot System (Illumina)及 TruSeq PE 群集生成套組 v3 (Illumina# PE-401-3001)，將儲集的庫加載至單端流槽(Single End Flow Cell)上。TruSeq 技術支持使用專有的基於可逆終止子的方法 5 (2021 年 3 月 1 日)進行大量平行定序，從而能夠在單一鹼基被併入生長的 DNA 股中時對其進行檢測。在運行結束時，使用 TruSeq SBS v3 試劑 (Illumina# FC-401-3001) 在 HiSeq2500 儀器(Illumina)上生成約 30M 的 75 bp 單端讀數。最後，根據 Illumina Pipeline 數據分析生成解多功的 FASTQ 檔案。

生物資訊學分析

【0085】使用 TrimGalore http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/，從單端讀數中修除低品質末端及轉接子。使用 Kallisto (Bray et al, 2016)估計轉錄本豐度，並使用 DeSeq2 R 套裝軟體 (Love et al, 2014)及 FDR 校正 p 值 <0.05 來鑑定差異表現的 (differentially expressed, DE) 基因。

定量即時 PCR

材料與方法

測試項目

| | |
|----------|---|
| 鑑定 | ITF3756 |
| 批號 | 9 |
| 純度 | >95% |
| 分子式 | C ₁₃ H ₁₁ N ₅ O ₂ S |
| 分子量 | 301.32 g/mol |
| 到期/重測日期 | 11/2021 |
| 保存條件 | -20°C |
| 來源及製造商 | Italfarmaco SpA |
| 特殊處理注意事項 | 所有進行研究的人員的常規保護(口罩、手套及眼鏡) |

測試項目使用溶液

【0086】測試項目已溶於 DMSO 中並在適當的培養基中稀釋至所需的最終濃度。

實驗設計

【0087】為了擴展本發明的可行性，亦在 PBMC 中測試了 ITF3756 調節 17 個基因的 mRNA 表現的潛力。藉由比較上述基因在經處理的細胞與經媒劑處理的細胞中的表現來確定基因表現。

以測試項目處理 PBMC

【0088】PBMC 以 1×10^6 個細胞/ml 的密度再懸浮於 RPMI 1640 培養基 (Dutch modified, ThermoFisher)。將細胞接種於 6 孔盤 (Corning) 中，每孔 3 ml。以四種濃度的 ITF3576 處理細胞：0.25、0.5、1 及 2 μM 。每個處理濃度在 3 個孔中重複，用於實驗三重複測試。將媒劑 (DMSO 0.05%) 處理的細胞以相同的密度及體積接種。將盤在 37°C 5% CO_2 下培養 4 小時。在處理培養結束時，收集細胞用於總 RNA 萃取。

RNA 萃取及反轉錄

【0089】以試驗化合物處理後，將 PBMC 從 6 孔盤中取出並收集在 15 ml 試管 (Falcon) 中。以 1 ml PBS pH 7.4 (ThermoFisher) 將孔洗滌一次，並將洗滌體積添加至收集的細胞懸浮液中。將細胞懸浮液以 1500 rpm 離心 10 分鐘。丟棄上清液，並將來自 RNeasy Mini 套組 (Qiagen) 的 350 μl 裂解緩衝液添加至細胞沉澱物中。將裂解的細胞上下移液 10 次以分散細胞碎片。然後依據包括 DNase 步驟的 RNeasy Mini 套組的步驟準則進行 RNA 萃取程序。

【0090】使用 Nano Drop 1000 分光光度計測定 RNA 濃度。使用無核酸酶水 (Ambion) 以在 16 μl 之體積中為 50 ng/ μl 的方式稀釋 RNA。如下所示，將 Superscript VILO IV 試劑 (Invitrogen) 添加至 RNA 中。

表 1.用於擴增而添加至 96 孔盤的孔中的試劑

| | 體積/孔 (μL) |
|---------------------|-----------|
| Superscript VILO IV | 4 |
| cDNA (50 ng/uL) | 16 |
| 總體積 | 20 |

【 0091 】 反轉錄反應在儀器 iCycler iQ™ (Bio-Rad) 上的 96 孔盤中進行以下的熱循環：於 25°C 10 分鐘、於 50°C 10 分鐘及於 85°C 5 分鐘。然後將 20 μl 產生之 cDNA 以 40 μl TE 緩衝液 (Invitrogen) 稀釋至 13.3 ng/μl 的最終理論濃度。

基因表現檢測

【 0092 】 TaqMan 20x 基因表現測定試劑 (Applied Biosystems) 用於檢測基因轉錄本，如表 2 所示。

表 2.用於 qPCR 的 TaqMan 測定的特徵

| 基因名稱 | 測定名稱 | 跨距外顯子(Span exon) | 擴增物長度(bp) |
|----------------|---------------|------------------|-----------|
| NBEAL2 | Hs01035331_g1 | 是 | 73 |
| SLC27A1 | Hs01587911_m1 | 是 | 120 |
| LTBP4 | Hs00943217_m1 | 是 | 61 |
| ANXA6 | Hs01049082_m1 | 是 | 68 |
| IRF6 | Hs00196213_m1 | 是 | 93 |
| STAB1 | Hs00248439_m1 | 是 | 79 |
| CD84 | Hs01547121_m1 | 是 | 75 |
| CD276/B7-H3 | Hs00987207_m1 | 是 | 65 |
| RANK/TNFRSF11A | Hs00921372_m1 | 是 | 75 |
| CXCL2 | Hs00601974_m1 | 是 | 100 |
| CXCL3 | Hs00171061-m1 | 是 | 99 |
| PD-L1/CD274 | Hs00204257_m1 | 是 | 77 |
| CD206/MRC1 | Hs02832367_g1 | 是 | 81 |
| CD204/MSR1 | Hs00234007_m1 | 是 | 63 |
| CD163 | Hs00174705_m1 | 是 | 72 |
| ADA | Hs01110947_m1 | 是 | 76 |
| MMP-9 | Hs00957555_m1 | 是 | 79 |
| 持家基因 | | | |
| UBC | Hs00824723_m1 | 是 | 71 |
| B2M | Hs99999907_m1 | 是 | 75 |
| HPRT1 | Hs99999909_m1 | 是 | 100 |

【0093】使用連接至 CFX 96 Touch 即時 PCR 檢測器系統 (Bio-Rad) 的 CFX C1000™ 觸控式熱循環儀進行即時 PCR。qPCR 反應在 96 孔盤 (硬殼 PCR 盤, Bio-Rad) 中以含有 AmpliTaq Gold® DNA 聚合酶的 Universal Master Mix 試劑 (Applied) 進行。將對應於 40 ng 模板的 3 µl cDNA 添加至 PCR 反應試劑中, 總體積為 15 µl, 如下所示:

將報告閾值循環 (Ct) 值的自動 Excel 報告導出用於原始數據收集, 隨後詳細說明用於表現調節的計算。

數據採集

【0094】比較處理與未處理樣品中的 mRNA 水準, 評估 mRNA 表現調節水準; 所有數據都相對於對應樣品中三個持家基因 (參考基因: UBC、B2M 及 HPRT1) 的平均表現訊號進行標準化。

【0095】為了確定測試項目的調節潛力, 使用了「 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 」方法。

【0096】對各處理條件及各目標計算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 作為單一重複 (single replicate)

$$-\Delta\Delta Ct = -(\text{處理的 } \Delta Ct - \text{未處理的 } \Delta Ct)$$

處理的 $\Delta Ct = \text{處理的 } Ct_{\text{TARGET}} - \text{處理的 } Ct_{\text{REFERENCE}}$

未處理的 $\Delta Ct = \text{未處理的 } Ct_{\text{TARGET}} - \text{未處理的 } Ct_{\text{REFERENCE}}$

未處理的 Ct_{TARGET} 意圖作為三個未處理重複的平均值

處理的 Ct REFERENCE 意圖作為三個持家基因的單一重複的平均值

未處理的 Ct REFERENCE 意圖作為所有未處理重複的三個持家基因之 Ct 值的平均值。

【0097】對於顯示 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值低於 1 (調降)的處理樣品，倍數調節值被報告為未處理的對照 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值(對應於 1，無調節)與處理的樣品 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值之間的比率，添加一個減號來概述調降。

【0098】當 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值大於 1 時，存在調升。倍數調節值被報告為未處理的對照 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值(對應於 1，無調節)與處理的樣品 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值之間的比率。

電腦系統

【0099】此研究中用於獲取及定量數據的電腦系統包括以下系統：

系統名稱 功能

Spylog v 1.1 冰箱及冰櫃的電子溫度監控系統。供應商：AHSI。

CFX 96 Touch 即時 PCR 檢測系統。供應商：Bio-Rad Laboratories

NanoDrop 1000 分光光度計。供應商：ThermoFisher

iCycler iQTM 熱循環儀。供應商：Bio-Rad Laboratories

統計分析

【0100】所有數據均以平均值±標準偏差的形式給出，並且為實驗三重複的平均值。使用雙尾 Student t-檢定進行組別間的統計評估(處理的樣品與未處理的樣品)。

【0101】在圖表中，閾值線對應於從媒劑處理的對照(1)±0.7的偏差(0.7代表3次倍數變化的標準偏差(SD)，用於所有樣品的持家基因)。**P值<0.05，*P值<0.1。

5.參考資料

【0102】

1. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. K J Livak et al, Methods 25, 402-408 (2001)

結果

RNAseq

【0103】將單核球培養4小時後，RNAseq分析顯示，在以ITF3756處理的樣品中鑑定出數百個 $p_{adj} < 0.05$ 的差異表現基因，以TNF- α 及ITF3756 + TNF- α 之組合的處理可能不會產生 $p_{adj} < 0.05$ 的調節。

【0104】表3顯示在指定組別中每種處理與媒劑處理之對照(don)的調升及調降的基因數量。

表 3. 根據單核球之處理的調節基因數量

| | 基因調升 | 基因調降 |
|----------------------------|------|------|
| ITF3756/don | 1499 | 1503 |
| ITF3756_TNF- α /don | 2282 | 2329 |
| TNF- α /don | 1563 | 1688 |

【 0105 】 樣品與樣品間距離及主成分分析(分別為圖 2A 及 2B)顯示，可根據處理確定四個不同的群體。此表明不同群體中明顯不同的基因表現及根據處理的樣品群集。整體而言，此兩項分析都表明對於不同處理的反應是均一的。這是值得注意的，因為預期不同的供體會有不同的反應。

【 0106 】 然後我們鑑定被 TNF- α 、ITF3756 及 ITF3756 + TNF- α 選擇性調升或調降的基因。圖 3A 及圖 3B 分別顯示相對於對照調升或調降的基因的文氏圖。

【 0107 】 這些圖表明有 537 個基因被 ITF3756 特異性地調升，386 個基因被特異性地調降。我們對這些基因特別感興趣，因為從中可鑑定出對於 ITF3756 的特定印記。

【 0108 】 我們首先分析 PD-L1 (CD274)的表現，以驗證其由 TNF- α 誘導的調升及其由 ITF3756 的抑制。圖 4 顯示 ITF3756 在以 TNF- α + ITF3756 處理的細胞中誘導 PD-L1 基因表現的強烈調降(59%)。

【 0109 】 然後，我們在調升或調降的基因中搜尋可對 ITF3756 的生物活性產生影響的基因。表 4 總結了我們選擇的基因。

表 4. 所選擇的可能影響 ITF3756 生物活性的調升及調降的基因。

| 調升的基因 | 調降的基因 | 於 TNF- α 下調降的 |
|---------|----------------|----------------------|
| NBEAL2 | CD84 | CD274 (PD-L1) |
| SLC27A1 | CD276 | |
| LTBP4 | RANK/TNFRSF11a | |
| ANXA6 | CXCL2 | |
| IRF6 | CXCL3 | |
| CD40 | STAB1 | |

【 0110 】 我們的實驗清楚證實 ITF3756 強烈調降 CD84 的表現，如圖 5A 所示。以 ITF3756 1 μ M 處理的人類單核球調降 CD84 的表現，且此種調降在促發炎刺激 (諸如 TNF- α) 存在的情況下進一步增強。圖 5B 及圖 5C 分別顯示 CD84 的示意結構及免疫細胞表現。

【 0111 】 RANK (TNFRSF11A) 及 RANKL (TNFRSF11) 係 TNF-受體超家族的成員。RANK 可在多種細胞類型上表現，包括腫瘤微環境中的癌細胞、上皮細胞及巨噬細胞。與 RANKL 的相互作用導致腫瘤細胞的增殖及細胞遷移、血管生成及巨噬細胞募集及 M2 分化。ITF3756 誘導單核球 RANK 的強烈調降 (參見圖 6)，暗示可能抑制 M2/促腫瘤巨噬細胞分化。此與我們的數據一致，表明在 ITF3756 存在下在活體外分化的 M1 巨噬細胞增加。亦可觀察到，當以 TNF- α 與 ITF3756 處理細胞時，與單一處理相比，RANK/TNFRSF11a 的調降增加。

【 0112 】 趨化介素係趨化細胞介素 (chemoattractant cytokine) 家族，其在細胞通過小靜脈從血液遷移到組織

以及從組織遷移到血液中起著至關重要的作用。CXCL2 及 CXCL3 係涉及單核球性 MDSC 募集及生成的兩種趨化介素，且已提議對它們進行抑制以減少 mo-MDSC 的生成並改善宿主免疫監測 (Shi et al., 2018)。如圖 7A 所示，ITF3756 降低 CXCL2 的表現並恢復由建立正常表現程度的 TNF 所誘導的調升。

【0113】CXCL3 為另一種趨化介素，其影響人類單核球衍生之樹突細胞的分化及功能，將它們推向骨髓衍生之抑制性細胞 (myeloid-derived suppressor cell, MDSC) 樣表型。此外，MDSC 本身表現 CXCR2 受體，其可被 CXCL3 活化，促進它們向腫瘤微環境遷移，如 KRAS 突變的大腸直腸癌中所述 (Liao et al., (2019) Cancer Cell 35:559-572)。如圖 7B 所示，ITF3756 降低這種趨化介素 CXCL3 的表現。

【0114】兩種趨化介素的活性以及對 RANK 表現的影響，暗示 ITF3756 調降與抑制性骨髓細胞表型相關的基因的表現。

【0115】STAB1 亦稱為 Clever-1/Stabilin-1，係另一種與巨噬細胞及單核球從免疫抑制性表型至促發炎性表型之表型變化相關的重要基因。STAB1 被 ITF3756 強烈調降，並在 TNF- α 存在下協同地減少 (圖 8)。

【0116】在被 ITF3756 調升的基因中，我們選擇了 NBEAL2 (圖 9) 及 LTBP4，NBEAL2 為與顆粒發育相關的含 BEACH 結構域的蛋白質，LTBP4 為轉化生長因子 β (TGFB1、TGFB2 及 TGFB3) 的關鍵調節因子，通過在細

胞外空間儲存期間將其維持在潛伏狀態來控制 TGF- α 的活化。LTBP4 基因被 TNF- α 調降兩倍(參見圖 10)。

【0117】我們的結果證實 ITF3756 抵消了此種調降，但效果係在沒有進一步調升的情況下恢復正常的控制水準。

【0118】圖 11 顯示 ITF3756 對 FATP1/SLC27A1 表現的影響。此基因參與巨噬細胞的促發炎反應(Nishiyama et al. (2018) *International Immunopharmacology* 55, 205-215)，因此使其成為可能參與巨噬細胞媒介的促發炎性、抗腫瘤反應的基因。與 TNF- α 相比，ITF3756 對此基因具有相反的作用，並且當以兩者的組合處理細胞時，該基因的基礎表現得以維持。

【0119】另一個可能在作為骨髓細胞之促發炎作用的媒介中起作用的基因係干擾素調節因子 6 (IRF6)，其屬於九個轉錄因子家族，這些轉錄因子共享一個高度保留的螺旋-轉折-螺旋 DNA 結合域及一個較低保留的蛋白質結合域。大多數的 IRF 在病毒感染後調節干擾素的表現。其他 IRF 成員受到 ITF3756 調控，但更強的基因表現變化發生在 IRF6 上。

【0120】圖 12 顯示僅 ITF3756 誘導 IRF6 表現的調節，而 TNF- α 或組合並無效果。

【0121】Annexin 6 (AnxA6)係在 ITF3756 處理後顯示強烈的調升的另一基因。在 TNF- α 存在的情況下，調升甚至更為強烈並且可能具有協同作用，如圖 13 所示。

【0122】CD40 係 TNF 受體超家族的成員，其在多種細胞類型上表現，包括單核球/巨噬細胞及樹突細胞。其被它的天然配體 CD40L 接合，導致 T 細胞活化及抗腫瘤巨噬細胞的誘導。活化 CD40-CD40L 軸 (CD40-CD40L axis) 以誘導抗腫瘤免疫反應的方法已有很多種，最近的方法係使用促效性抗 CD40 抗體。在 MTD 以下觀察到生物作用及臨床反應。此外，不良事件似乎在臨床環境中很容易控制。藉由 ITF3756 獲得之 CD40 基因表現的誘導 (圖 14) 暗示它可能有助於在活體外及活體內以該化合物觀察到的整體抗腫瘤免疫刺激。

【0123】如表 3 所示，許多基因被 ITF3756 調節。其中一些已被確定為腫瘤相關巨噬細胞 (TAM) 的特異性標記。儘管此分析係在單核球上進行，但這些基因的調節可對 TAM 的發展具有影響，TAM 為主要的先天免疫細胞，可構成人類腫瘤細胞質量很大的一部分 (高達 50%)。TAM 具有高度異質性，它們可從常駐的組織特異性巨噬細胞發展而來，以及通過趨化梯度 (chemoattractant gradient) 從由循環中募集的單核球發展而來。癌症類型、分期及腫瘤內異質性強烈影響 TAM 群。大多數的 TAM 受腫瘤微環境的安排以支持原發性腫瘤生長及轉移擴散。然而，腫瘤微環境可影響 TAM 來限制腫瘤的生長及轉移 (Larionova et al., 2020)。具有 M2 表型的促腫瘤巨噬細胞表現特定的標記，其中一些在以 ITF3756 處理的單核球中被強烈調降，如表 5 所示，支持了一旦單核球被募集至腫瘤組織就會誘導抗腫瘤表型的可能意涵。

表 5. M2 相關基因在人類單核球中被 ITF3756 調降。

| M2 標記 | 倍數變化 |
|-----------------------------|--------|
| CD163 | - 4 |
| CD204/MSR1 | - 2.6 |
| CD206/MRC1 | - 13.3 |
| MMP9 | - 3.6 |
| STAB1 (Stabilin-1/Clever-1) | - 14 |
| ADA | - 1.9 |

【 0124 】 圖 8 (stabilin-1)及圖 15 至 19 顯示表 5 中基因的調節，包括受 TNF- α 及 TNF- α + ITF3756 組合影響的那些調節。

ITF3756 在 PBMC 中發揮其基因調節活性

【 0125 】 與單核球相比，周邊血液單核細胞可以更簡單且更快速的方式單離。因此，我們使用定量即時 PCR 測試了 ITF3756 對此細胞群的基因調節活性。

【 0126 】 結果表明，使用此方法獲得的結果與使用單核球及 RNAseq 獲得的結果一致。圖 20 顯示於兩個例示性基因所獲得的結果，STAB1 (圖 20A)及 IRF6 (圖 20B)分別被 ITF3756 調降及調升。

在腫瘤微環境中轉錄本的離體基因表現將 IRF6、MMP9 及 CD40 鑑定為與抗腫瘤反應相關的生物標記

材料與方法

動物飼養管理

環境馴化

【 0127 】 在接收動物及治療開始之間允許最少 14 天的馴化期，以使動物適應實驗室環境。

飼養

【0128】將小鼠在帶有鋼格柵蓋以及粉碎並滅菌的無塵墊料木屑床架的 makrolon 籠中(26.7 x 20.7 x h 14 cm)(4-5 隻小鼠/籠)飼養。飲食及水供應：飲用水供應不受限。在整個研究過程中，每天為每隻小鼠提供完整的顆粒小鼠飼料(4RF21，Mucedola)。

環境條件

【0129】動物在光暗循環下飼養，保持溫度及濕度恆定。動物房的參數評估如下：溫度 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，相對濕度 $55 \pm 10\%$ ，約 15-20 次過濾的空氣變化/小時，及上午 7 點至晚上 7 點的 12 小時人造光晝夜循環。

環境馴化

【0130】在接收動物及治療開始之間允許最少 14 天的馴化期，以使動物適應實驗室環境。

【0131】ITF3756 (N-羥基-4-((5-(噻吩-2-基)-1H-四唑-1-基)甲基)苯甲醯胺)。ITF3756 由 Italfarmaco SpA 的藥物化學部門合成。ITF3756，批次 8，以粉末溶解在 DMSO 中並儲存在 -20°C 。

藥理治療

表 6.使用的 ITF3756 及藥理治療

| 鑑定 | ITF3756 批次 8 |
|--------|---|
| 調配物類型 | 媒劑溶液 |
| 劑量濃度 | 5 mg/ml |
| 製備說明 | 稱取適量的測試化合物，並在 DMSO 中製成 100 mg/mL 的溶液。以 H ₂ O/PEG 1:1 稀釋此溶液以達到測試物品所需的劑量(5 mg/ml 溶液)。保持在磁力攪拌下。 |
| 製備頻率 | 在投藥當天製備測試調配物 |
| 保存條件 | 室溫 |
| 來源及製造商 | Italfarmaco SpA |
| 劑量及途徑 | 10 mg/kg 腹腔內注射 |
| 治療排程 | 從第 10 天(星期一)至第 20 天每天一次。週六、週日不投藥。總共 8 次投予 |
| 體積 | 10 mL/kg (50 mg/kg)。基於投藥當天記錄的體重計算個體劑量體積。 |

表 7.使用的抗 PD-1 抗體及藥理治療

| | |
|--------|--|
| 鑑定 | 抗小鼠 PD-1 |
| 批號 | 735019O1 及 786520N1B |
| 調配物類型 | PBS 溶液 |
| 劑量及途徑 | 10 mg/kg 腹腔內注射 |
| 治療排程 | 從第 10 天(星期一)至第 20 天每隔一日進行。週六、週日不投藥。總共 5 次投予 |
| 製備說明 | 7.7 mg/mL (lot. 735019O1)或 8.31 mg/mL (lot. 786520N1B)的即用型溶液。然後以 PBS 稀釋至目標濃度 |
| 製備頻率 | 在投藥當天製備測試調配物 |
| 保存條件 | + 4°C，避光 |
| 來源及製造商 | BioXCell |

表 8.使用的同型抗體及藥理治療

| | |
|--------|---|
| 鑑定 | Rat IgG2b 同型對照 |
| 批號 | 707119D1 |
| 調配物類型 | 醫藥製劑 |
| 劑量及途徑 | 10 mg/kg 腹腔內注射 |
| 治療排程 | 從第 10 天(星期一)至第 20 天每隔一日進行。週六、週日不投藥。總共 5 次投予 |
| 製備說明 | 9.16 mg/mL 即用型溶液。然後以 PBS 稀釋至目標濃度 |
| 製備頻率 | 在投藥當天製備測試調配物 |
| 保存條件 | + 4°C，避光 |
| 來源及製造商 | BioXCell |

研究設計

【 0132】 將成年 BALB/c 小鼠以 1×10^6 CT26 腫瘤細胞(以磷酸鹽緩衝食鹽水稀釋至 100 μ l)進行皮下注射，並當腫瘤體積達到 75-100 mm^3 時以抗 PD1 或 ITF3756 治療，藉由 RNAseq 探索腫瘤微環境中基因的調節。由於 ITF3756 作用於 PD-1/PD-L1 軸(PD-1/PD-L1 axis)，此種方法允許鑑定對於兩種治療為特異性及共通性的基因。表 9 描述了整體排程。

表 9. 治療的整體排程

| 組別 | 小鼠 | 皮下注射 CT26 | 治療 | 頻率 | 註 |
|----|----|--------------|---------|----------------------------|----------------------------|
| 1 | 5 | + | 未治療 | | |
| 2 | 5 | + | ITF3756 | 從星期一至星期五+從星期一至星期三。8 次投予 | 50 mpk os；在最後一次治療後 1 小時犧牲 |
| 3 | 5 | + | ITF3756 | 同上 | 50 mpk os；在最後一次治療後 4 小時犧牲 |
| 4 | 5 | + | ITF3756 | 同上 | 50 mpk os；在最後一次治療後 18 小時犧牲 |
| 5 | 5 | + | ITF3756 | 同上 | 50 mpk os；在最後一次治療後 24 小時犧牲 |
| 6 | 5 | + | 媒劑 | 同上 | 在最後一次治療後 4 小時犧牲 |
| 7 | 5 | + | 抗 PD1 | 星期一-星期三-星期五+星期一-星期三) 5 次投予 | 10 mpk ip；在最後一次治療後 1 小時犧牲 |
| 8 | 5 | + | 抗 PD1 | 同上 | 10 mpk ip；在最後一次治療後 4 小時犧牲 |
| 9 | 5 | + | 抗 PD1 | 同上 | 10 mpk ip；在最後一次治療後 18 小時犧牲 |
| 10 | 5 | + | 抗 PD1 | 同上 | 10 mpk ip；在最後一次治療後 24 小時犧牲 |
| 11 | 5 | + | 同型 AB | 同上 | 10 mpk ip；在最後一次治療後 4 小時犧牲 |

免疫印漬分析

【0133】以 Triton 緩衝液 (50 mM Tris-HCl pH 7.5、250 mM NaCl、50 mM NaF、1 mM EDTA pH 8、0.1% Triton)，並輔以蛋白酶及磷酸酶抑制劑 (Roche, Germany) 來裂解小鼠脾臟獲得全細胞萃取物。藉由 SDS-PAGE 分離蛋白質，轉移至 PVDF 膜上並以 PBS-T 阻斷 (磷酸鹽緩衝食鹽水及含 5% 脫脂奶粉之 0.1% Tween-20，在室溫 (RT) 下阻斷 1 小時)。在室溫下與初級抗體培養兩小時，然後與適當的結合有辣根過氧化物酶之二級抗體培養。使用 ECL 西方印漬試劑 (Amersham) 進行檢測。使用的抗體為：小鼠抗乙醯微管蛋白 (Sigma, T6793)、小鼠抗微管蛋白 (Sigma, T6074)、山羊抗小鼠 IgG (H + L)-HRP 結合物 (Bio-Rad, 1706516)。

【0134】使用 ImageJ 軟體進行光密度分析。RNA

RNAseq

【0135】使用 Qiagen 萃取套組從急速冷凍的腫瘤中萃取 RNA，並儲存在 -80°C 。選擇雙端定序 (paired-end sequencing)，其中從 DNA 片段的末端獲得短讀數用於超高通量定序 (ultra-high-throughput sequencing)。在進一步分析之前，對定序數據進行品質檢查。所有樣品都包含 75 個核苷酸長度的序列 (75nt x 2)。

【0136】RNA-Seq 分析路線涉及幾個步驟：

1. 讀數的品質控制；
2. 去除低品質讀數；
3. 讀數疊接比對；
4. 總轉錄本 (transcriptome) 表現定量分析。

讀數的品質控制

【0137】品質控制係用於基於統計學及回報的圖形及表格來檢查原始數據定序之品質的方法，這些回報的圖形及表格提供有關可能出現問題的區域的訊息。

【0138】為了執行此步驟，我們使用用於高通量序列數據的工具，即 <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc> 上提供的 FastQC 工具。FastQC 工具回報一個 html 報告，您可在其中可視化有關原始數據定序的資訊。品質數值的計算係根據歷史「phred 分數」所執行的。

【0139】phred 分數 (q) 的品質數值使用數學標度以將鹼基 (s) 錯誤鑑定的估計機率轉換為對數標度：

$$q = -10 * \log_{10} (s)$$

【0140】錯誤地鑑定鹼基的機率等於 0.1 (10%)、0.01 (1%)及 0.001 (0.1%)分別產生 phred 分數(q 或 Q)的數值 10、20 及 30。

【0141】FastQC 工具給出簡易判斷(通過(綠色符號)、警告(橙色符號)、沒有通過(紅色符號))。phred 分數係回報在 QC 報告的「Per Base Sequence Quality」模組中。

去除低品質讀數

【0142】使用 NGSQCTool 套組工具以濾除具有低 Phred 品質分數的讀數。

讀數比對

【0143】使用具有雙端讀數之標準參數的生物資訊學工具 STAR (版本 2.4.0d)，將樣品對映至參考小鼠 (*Mus Musculus*)基因體(mm10) [4]。參考軌係從 Refseq 獲得的組合體 mm10。下表顯示每個樣品的對映讀數百分比。所有樣品的平均對映率高於 93%，核糖體含量低於 1%。

總轉錄本表現定量

【0144】使用 Cufflinks 對各定序樣品表現的轉錄本進行定量。Cufflinks 使用的測量單位為 FPKM (Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads，每百萬個對映讀數的每千個鹼基之轉錄本的片段數)，且其旨在衡量 RNA 池中轉錄本/基因的相對豐度。其並未意圖直接用於差異表現 (Differential Expression)，但其旨在是人類可讀取的，並考慮了主要的技術干擾因子，諸如數百萬讀數及基因長度。

反應者及非反應者的鑑定

【0145】根據第 20 天的腫瘤體積選擇反應者及非反應者。治療開始時(第 10 天)腫瘤的體積平均約為 75 mm^3 。基於此腫瘤體積值，我們根據以下標準對動物進行分類：

- 腫瘤體積小於或等於 75 mm^3 的動物被認為是有反應者(R)
- 腫瘤體積大於 75 mm^3 的動物被認為是無反應者(NR)

【0146】為了鑑定那些無論治療如何都可與 R 及 NR 相關的基因，所有 R 及 NR (包括未治療的動物)都被考慮在內。

【0147】為了鑑定由 ITF3756 調節之特定基因，該組及其對應之媒劑對照組中的所有動物都被考慮用於鑑定與腫瘤反應的可能相關性。

【0148】為了鑑定由抗 PD-1 治療調節之特定基因，該組及同型對照組中的所有動物都被考慮用於鑑定與腫瘤反應的可能相關性。

【0149】來自 RNAseq 數據的總計數用於比較 R 與 NR 之間的基因表現。

【0150】使用 GraphPad 軟體(第 9 版)，藉由非成對的 t 檢定確定統計學上的顯著性，p 值 ≤ 0.05 被認為是顯著的。

結果

ITF3756 目標接合：微管蛋白乙酰化增加。

【0151】為了確定 ITF3756 對 HDAC6 的抑制作用，在所有犧牲時間點(1 小時、4 小時、18 小時及 24 小時)收集動物的脾臟。藉由西方印漬術檢測微管蛋白乙醯化及總微管蛋白。

【0152】在最後一次投予後的不同時間點犧牲荷瘤動物。收集脾臟並製備總脾細胞懸浮液。將沉澱的細胞裂解以獲得藉由電泳分離的解凍的總蛋白質萃取物。在使用特異性抗體的西方印漬術後檢測微管蛋白及乙醯微管蛋白。

【0153】圖 21 顯示微管蛋白乙醯化迅速地發生。最後一次治療後 1 小時，所檢查的動物有強烈的增加，這種增加一直持續至 4 小時。更長的洗除時間導致微管蛋白乙醯化減少，但 18 小時後其仍然很高且一致。洗除 24 小時後獲得的結果表明，微管蛋白的乙醯化仍然可檢測到，但不是在所有分析的動物中，因為三隻動物中有一隻具有乙醯微管蛋白的基礎水準。

抗 PD-1 及 ITF3756 治療

【0154】如臨床前及臨床研究所證明的，抗 PD-1 免疫療法特別容易受到異質性反應。這種異質性取決於單一受試者對免疫系統刺激的反應。與 ITF3756 的免疫依賴性抗腫瘤活性一致，我們發現類似於抗 PD-1 治療動物的異質性反應。

【0155】對於這兩種治療，可鑑定出具有不同腫瘤減少的三組動物(圖 22 及圖 23)：

- 對治療無反應的動物(圖 22 中的 ITF3756 1；圖 23 中的抗 PD-1)
- 與第 10 天相比，腫瘤強烈或完全縮小的動物(圖 22 中的 ITF3756 2；圖 23 中的抗 PD-1 b)
- 腫瘤質量穩定或略高於治療開始時之腫瘤質量(75 mm³)的動物(圖 22 中的 ITF3756 3，圖 23 中的抗 PD-1 c)。對於相關性分析，僅考量該組中腫瘤體積小於或等於 75 mm³ 的動物。

MMP9 的調降與 IRF6 及 CD40 的調升與有反應者相關。

【0156】具有 M2 表型的促腫瘤巨噬細胞表現特定標記，其中一些在以 ITF3756 處理的單核球中被強烈調降，如表 3 所示。MMP9 為這些基因之一，因此它與巨噬細胞的促腫瘤發生表型有關。

【0157】我們發現在攜帶 CT26 的動物的腫瘤微環境中，MMP9 的調降與 ITF3756 組的有反應的動物顯著相關(圖 24)。當考慮所有動物或考慮抗 PD-1 組及相對對照時，不會發生這種關聯。

【0158】在腫瘤微環境中炎症的活化及控制對於適當刺激抗腫瘤免疫反應至關重要。我們已鑑定兩種參與 TME 從非發炎及免疫抗性到發炎及免疫容許的重塑過程的基因。一種基因係干擾素調節因子 6 (IRF6)。IRF6 屬於九個轉錄因子家族，它們共享一個高度保留的螺旋-轉折-螺旋 DNA 結合域及一個較低保留的蛋白質結合域。大多數的 IRF 在病毒感染後調節干擾素的表現。IRF6 因其與顱面發育有關而廣為人知，但它可能與

IRF1 一起在 MyD88 傳訊中發揮作用 (Honda and Taniguchi, 2006)。ITF3756 調升人類單核球中 IRF6 的表現，而我們發現它的調升與以 ITF3756 治療的有反應的動物有關 ($p < 0.1$)，如圖 25 所示。

【0159】明顯地，RNAseq 數據中 IRF6 計數最高的動物在 ITF3756 治療後腫瘤完全縮小。

【0160】CD40 的作用之前已簡要描述過。以 ITF3756 處理的人類單核球顯示 CD40 的基因表現增加，這與 T 細胞共刺激及抗腫瘤巨噬細胞的誘導直接相關。與此觀察結果一致，我們發現有反應的小鼠具有顯著更高的 CD40 基因表現 (圖 26B)。即使對於 CD40，如果考量所有動物及用抗 PD-1 抗體治療的動物，也未發現與有反應的小鼠的相關性 (圖 26A、圖 26C)。

【符號說明】

無。

【發明申請專利範圍】

【請求項 1】一種用於評估 HDAC6 抑制劑的有效劑量及/或生物活性的方法，其包含以下步驟：

- a) 確定在患者的生物樣品中至少一種由 HDAC6 抑制劑調節的 RNA 生物標記的表現程度，且該 RNA 生物標記係選自 CD84、RANK/TNFRSF11a、CXCL3、CXCL2、STAB1、CD163、CD204/MSR1、CD206/MRC1、MMP9、NBEAL2、LTBP4、ANXA6、FATP1/SLC27a1、ADA、CD276、CD40 或 IRF6 基因；
- b) 比較該表現程度與參考樣品的表現程度。

【請求項 2】如請求項 1 之方法，其中該 HDAC6 抑制劑的該有效劑量及/或該生物活性在受癌症影響的患者的治療期間或之後進行評估。

【請求項 3】如請求項 1 之方法，其進一步包含步驟 c) 將患者分類為對治療有反應或無反應。

【請求項 4】如請求項 1 之方法，其中將患者分類為對治療有反應或無反應係基於至少一種 RNA 生物標記的表現值是高於或低於表現閾值。

【請求項 5】如請求項 1 之方法，其為活體外或離體的方法。

【請求項 6】如請求項 1 之方法，其中該 RNA 生物標記 NBEAL2、LTBP4、ANXA6、FATP1/SCL27a1、CD40 或

IRF6 的表現程度被 HDAC6 抑制劑調升，且該 RNA 生物標記 CD84、RANK/TNFRSF11a、CXCL3、CXCL2、STAB1、CD163、CD204/MSR1、CD206/MRC1、ADA、CD276 或 MMP9 的表現程度被 HDAC6 抑制劑調降。

【請求項 7】如請求項 1 之方法，其中評估至少該 RNA 生物標記 STAB1、CD84、CD206/MRC1、MMP9、CD163、CD40 及 IRF6 的表現程度。

【請求項 8】如請求項 1 之方法，其中評估至少該 RNA 生物標記 MMP9、CD40 及 IRF6 的表現程度。

【請求項 9】如請求項 1 之方法，其中該 HDAC6 抑制劑係選自突巴辛(tubacin)、突巴司汀(tubastatin)、聶圖司他(nexturastat)、ACY-1215、ACY-738、ACY-1083、KA2507、T518、SW100 或 N-羥基-4-((5-(噻吩-2-基)-1H-四唑-1-基)甲基)苯甲醯胺(ITF3756)。

【請求項 10】如請求項 9 之方法，其中該 HDAC6 抑制劑為化合物 N-羥基-4-((5-(噻吩-2-基)-1H-四唑-1-基)甲基)苯甲醯胺。

【請求項 11】如請求項 1 之方法，其中該生物樣品為組織樣品或體液。

【請求項 12】如請求項 11 之方法，其中該組織樣品為腫瘤生檢或血液細胞。

【請求項 13】如請求項 11 之方法，其中該體液為血液、血清或血漿。

【請求項 14】如請求項 1 至 9 中任一項之方法，其中步驟 a)中該至少一種 RNA 生物標記的表現程度係藉由 RNA 定序、定量 RT-PCR、數位 PCR、Affymetrix 微陣列、定制微陣列或 NanoString 技術而檢測。

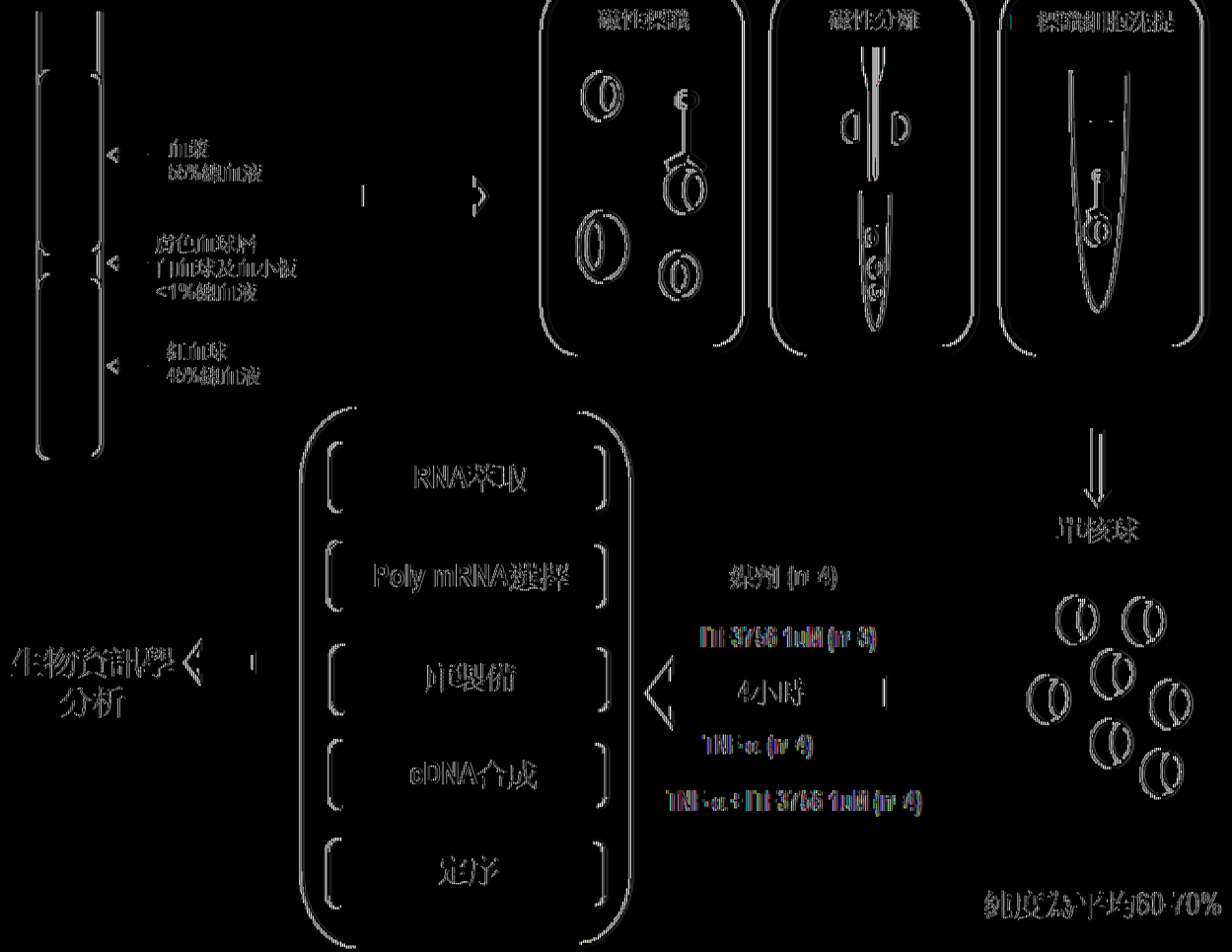
【請求項 15】如請求項 3 之方法，其中該癌症係選自腎上腺皮質癌、肛門癌、星狀細胞瘤 (Astrocytomas)、皮膚基底細胞癌、膀胱癌、腦腫瘤、乳癌、不明原發性癌、心臟腫瘤、子宮頸癌、膽管癌、大腸直腸癌、子宮內膜癌、食道癌、眼內黑色素瘤、輸卵管癌、膽囊癌、胃癌、胃腸道類癌瘤、胃腸道間質瘤 (GIST)、生殖細胞腫瘤、睪丸癌、頭頸癌、肝細胞癌、胰島細胞瘤、胰臟神經內分泌腫瘤、蘭格漢氏細胞 (Langerhans Cell) 組織球增多症、白血病、肺癌 (非小細胞、小細胞、胸膜肺母細胞瘤及氣管支氣管腫瘤)、黑色素瘤、梅氏細胞 (Merkel Cell) 癌、間皮瘤、伴隨 NUT 基因改變的中線道癌 (Midline Tract Carcinoma)、多發性內分泌腫瘤症候群、多發性骨髓瘤 / 漿細胞腫瘤、骨髓化生不良症候群、骨髓化生不良 / 骨髓增生性腫瘤、神經母細胞瘤、卵巢癌、胰臟癌、副神經節瘤、副甲狀腺癌、陰莖癌、嗜鉻細胞瘤、腦下垂體瘤、原發性腹膜癌、前列腺癌、腎細胞癌、視網膜母細胞瘤、肉瘤、皮膚鱗狀細胞癌、胸腺瘤及胸腺癌、甲狀腺癌、腎盂及輸尿管移行細胞癌、子宮癌、陰道癌、血管瘤、陰門癌或威爾姆斯氏瘤 (Wilms Tumor)。

【請求項 16】如請求項 15 之方法，其中該癌症為黑色素瘤、腎細胞癌、非小細胞肺癌或大腸直腸癌。

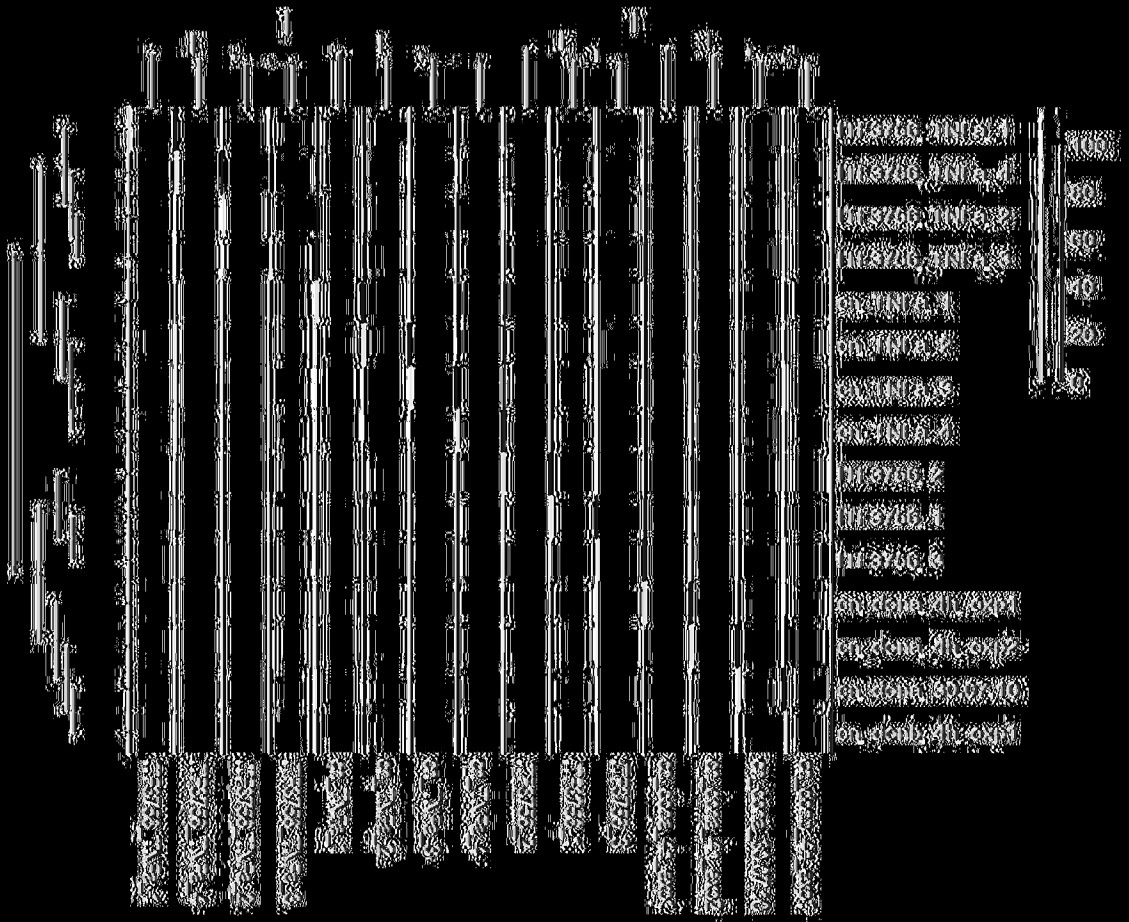
【請求項 17】一種用於評估 HDAC6 抑制劑之有效劑量及/或生物活性的套組，其包含多孔盤及用於測定如請求項 1 之至少一種 RNA 生物標記之表現程度的合適引子及/或探針。

|(發明圖式)|

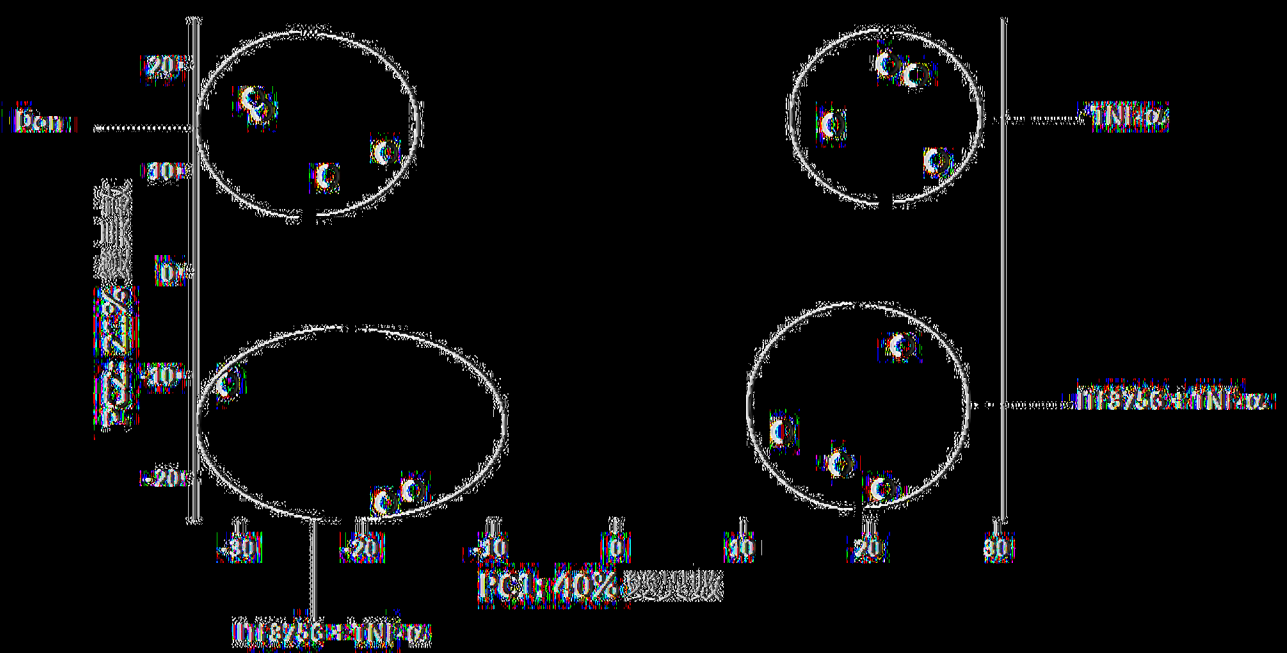
褐色血球膜分離



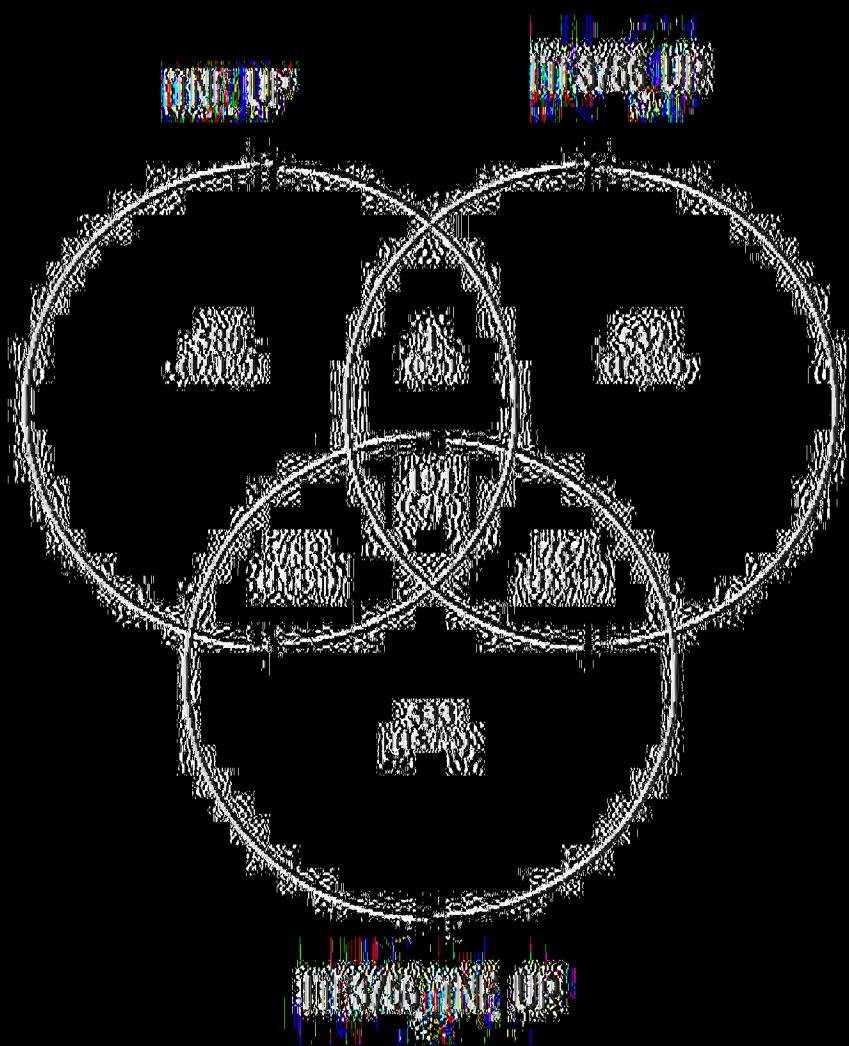
|(圖 1)|



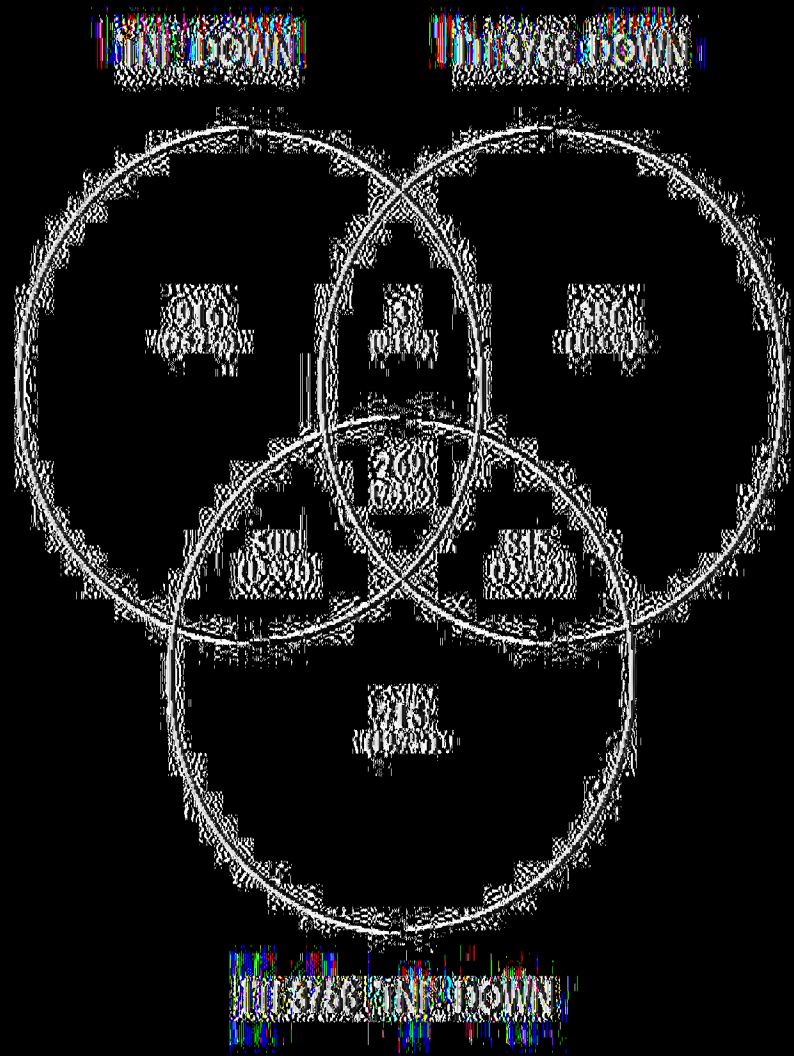
(圖 2.A)



(圖 2.B)

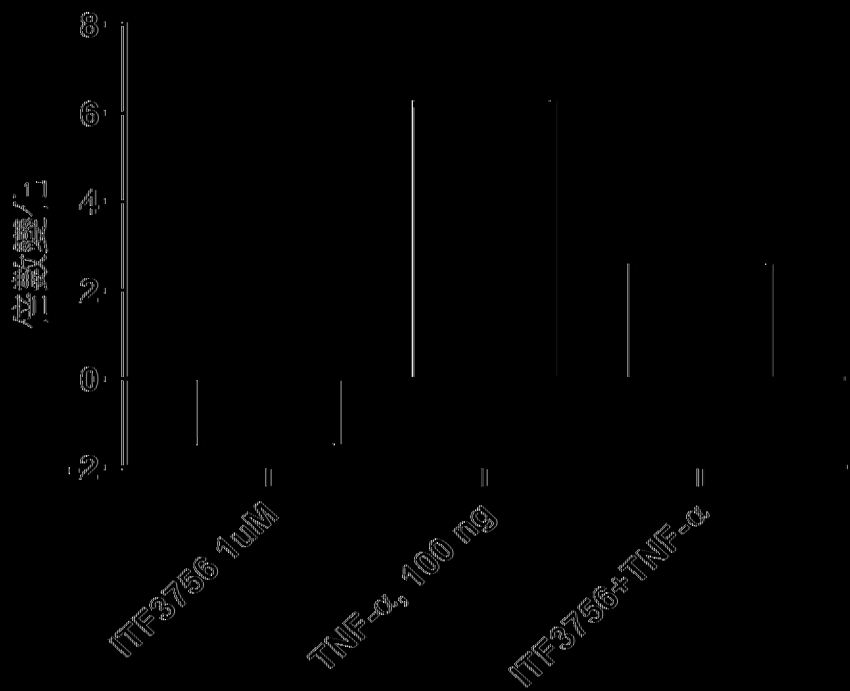


(图 3A)

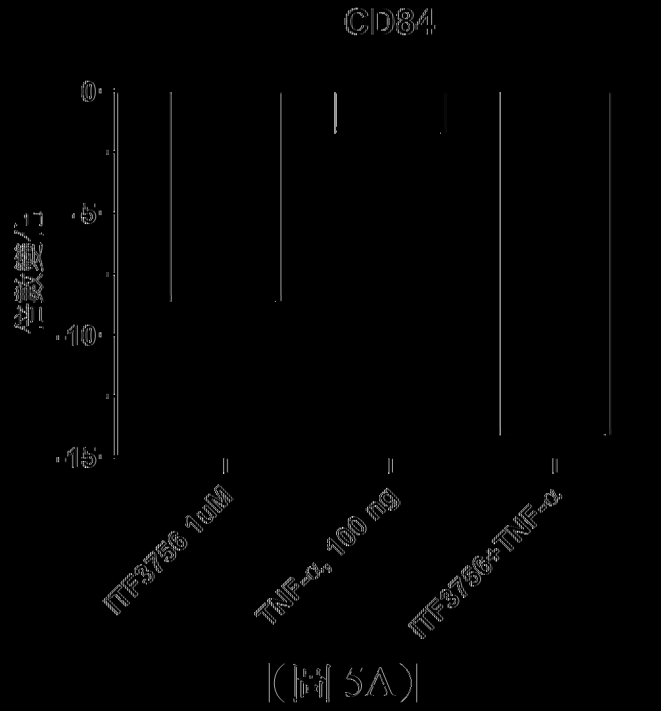


(111 3B)

CD274/PD.1.1

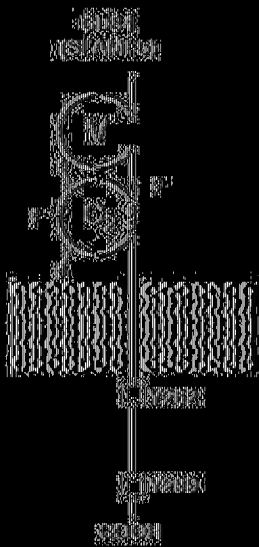


(圖 4)



5B

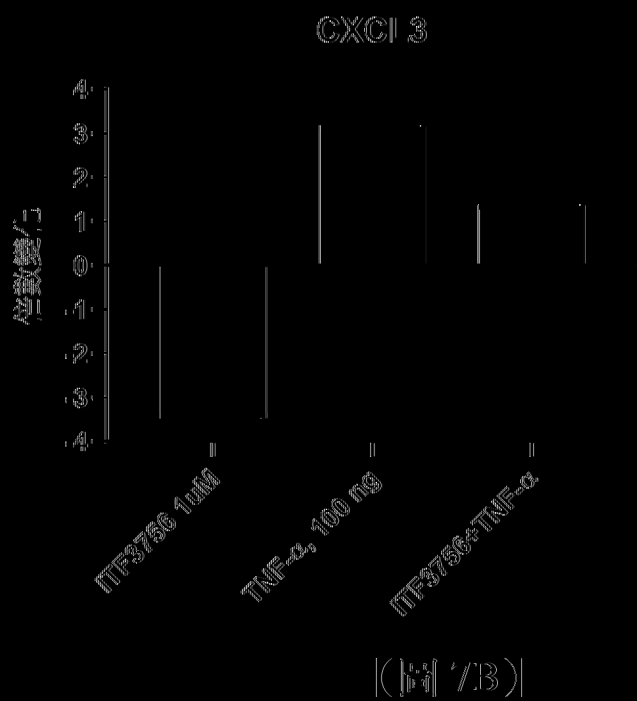
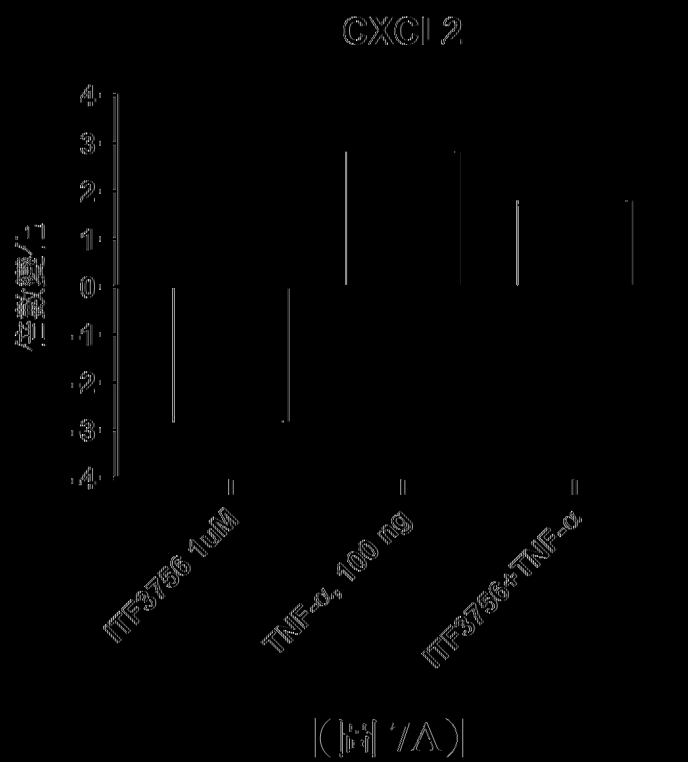
5C



| 來源 | 細胞類型 | CD84 |
|--------|--|---|
| 骨髓 | DCs | |
| 胸腺 | DN DP ⁺ CD84 ⁺ CD84 ⁺ | |
| 血液 | | |
| 淋巴細胞 | CD4 ⁺ 初始 CD4 ⁺ 記憶 CD8 ⁺ 初始 CD8 ⁺ 記憶 T _H 17 E _H 初始 E _H 記憶 自然殺細胞 | 陽性細胞 (%) 0-20% 21-40% 41-60% 61-80% >81% |
| 骨髓細胞 | 中性球 嗜酸性球 嗜鹼性球 單核球 巨噬球/樹突細胞 環形細胞/樹突細胞 | |
| 其他血液細胞 | 紅血球 血小板 | |

Cuconca M et al Clinical Immunology 2019

(圖 5B 5C)



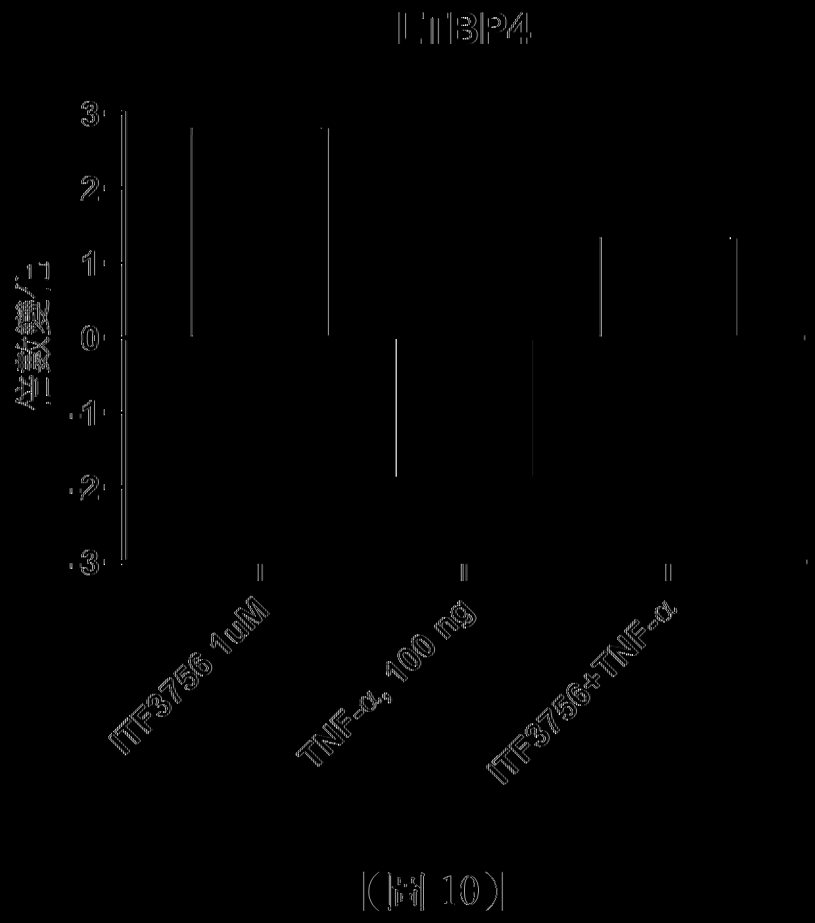


圖 6

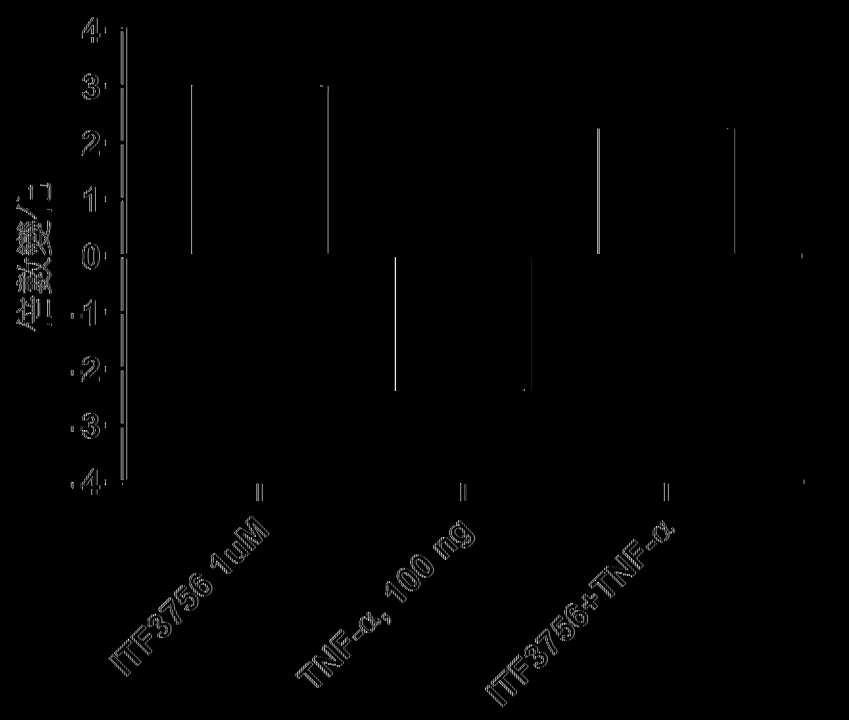
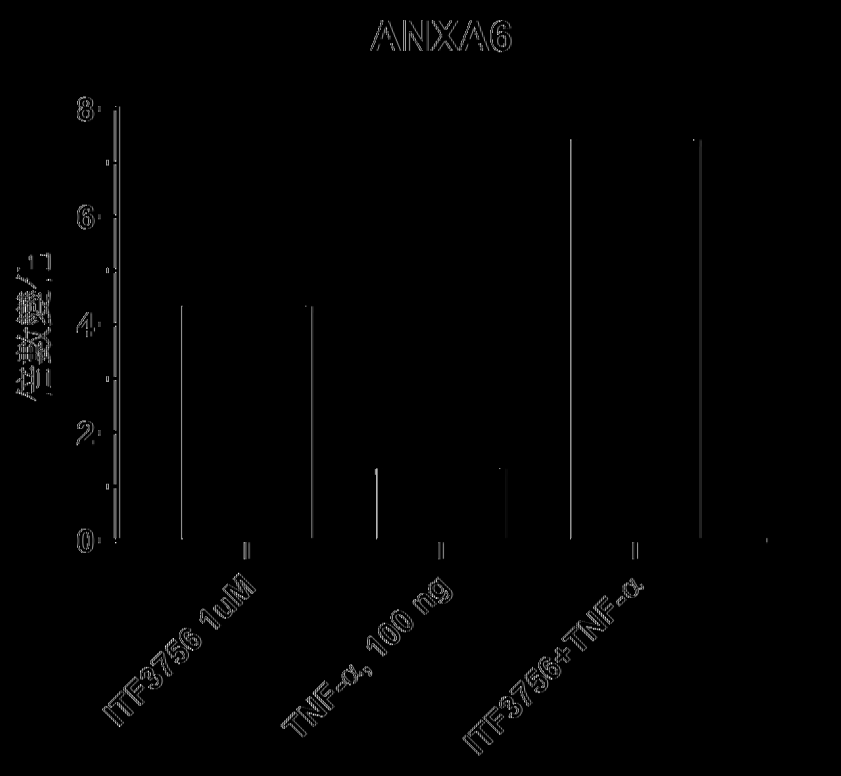
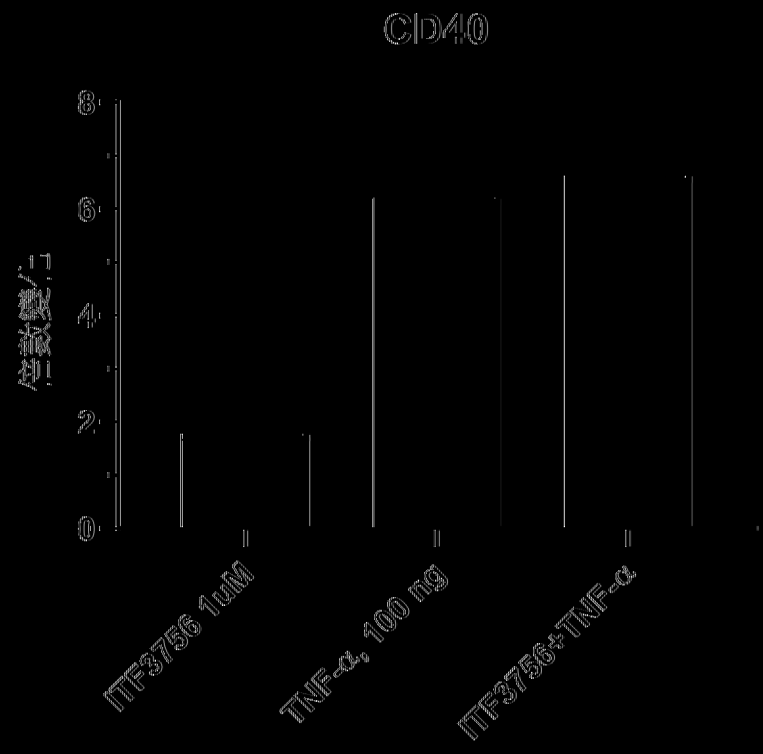


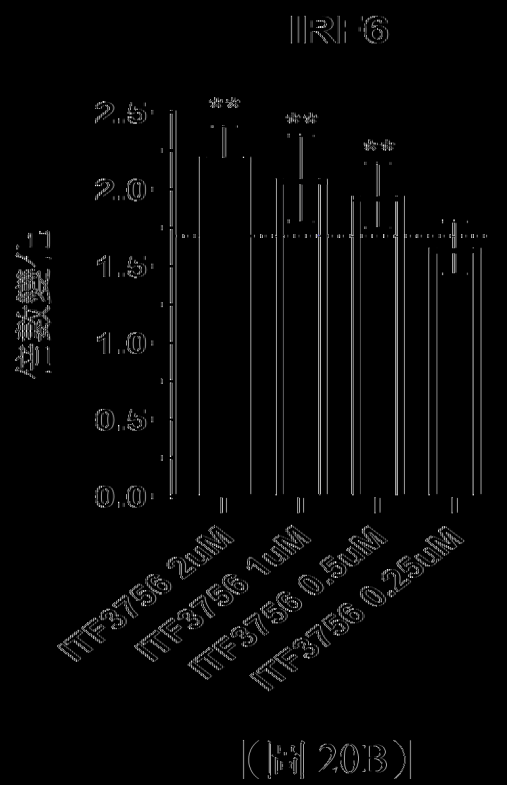
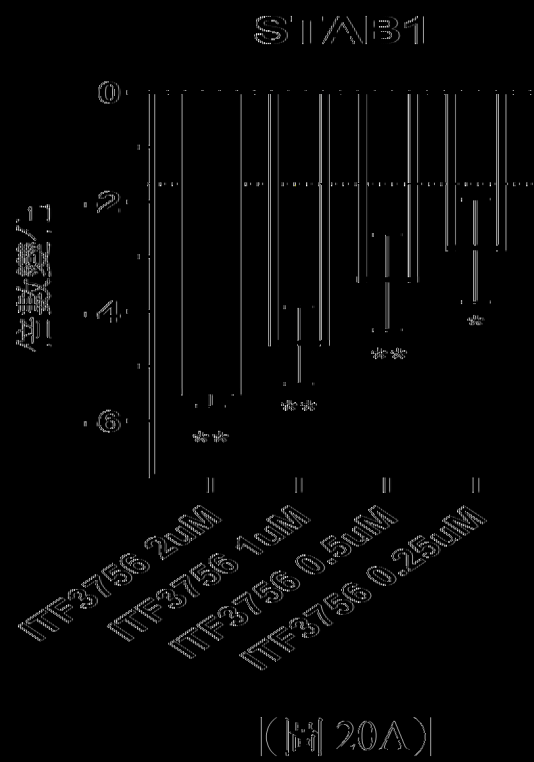
圖 12

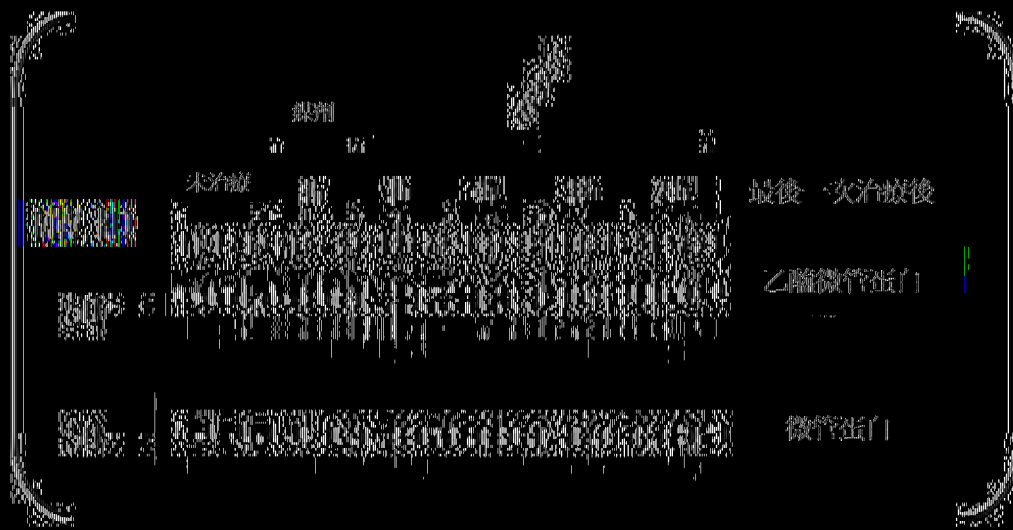


(Figure 13)

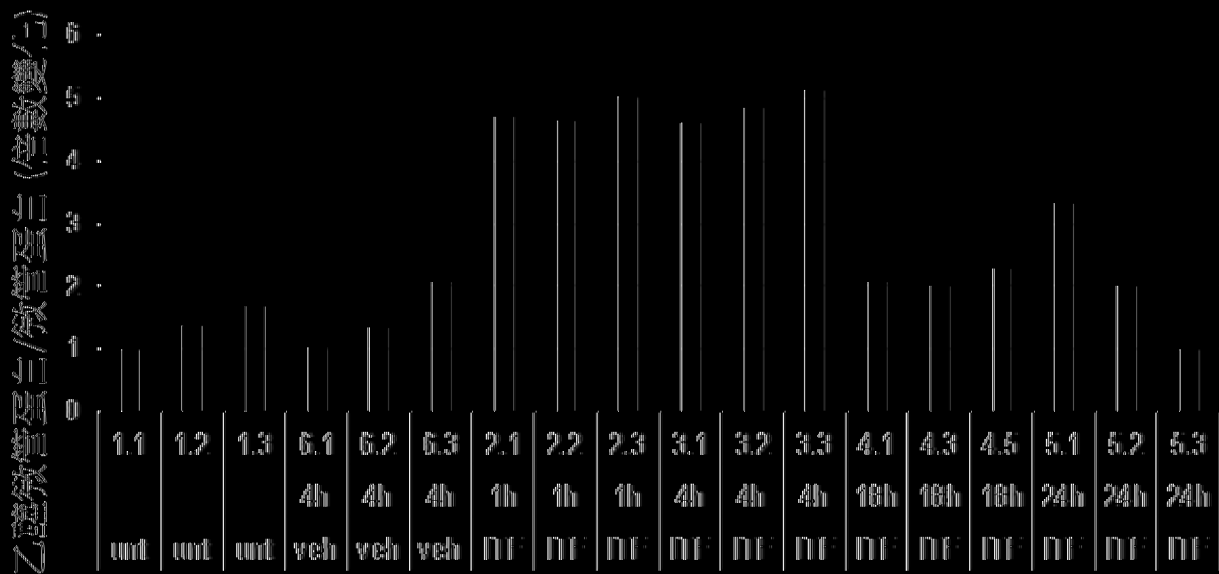


[(14) 14]





[(圖) 2.1A]



[(圖) 2.1B]

圖 3/56

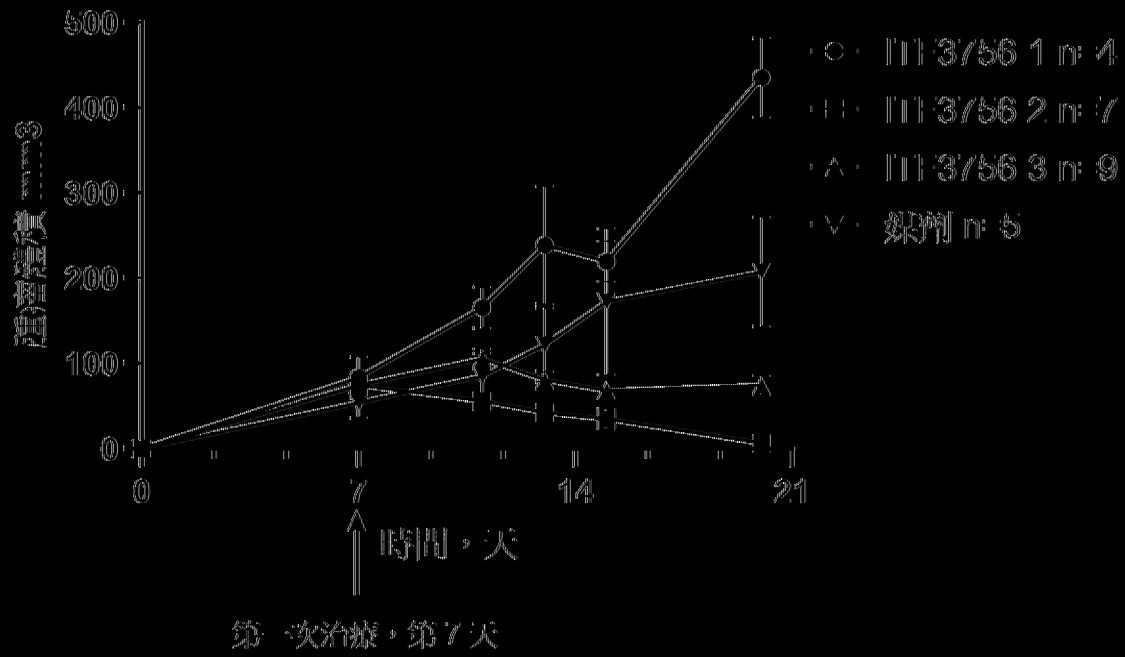
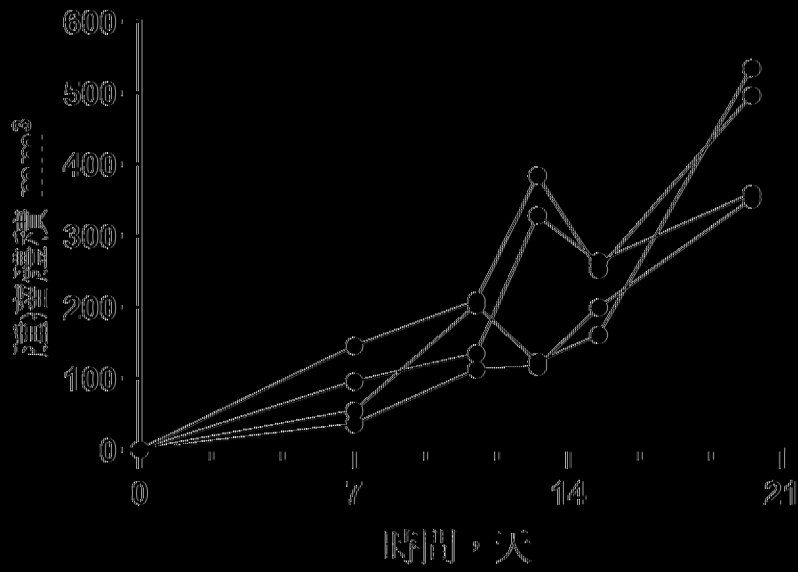


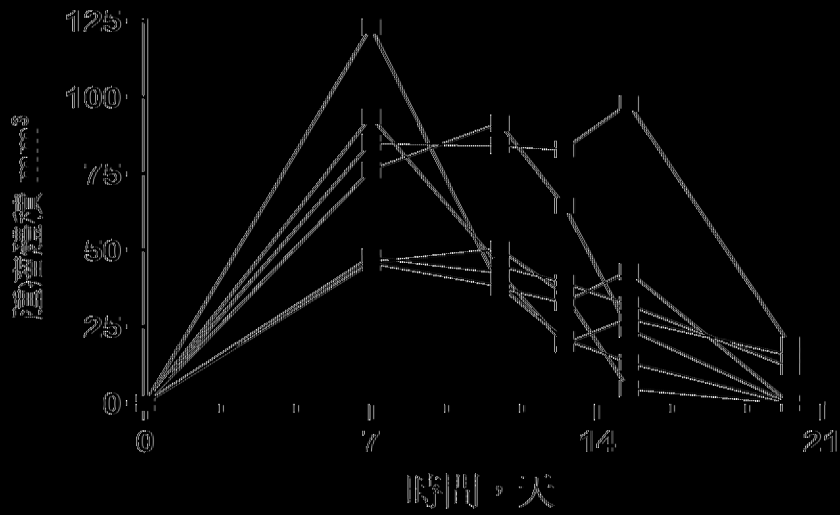
圖 22.A

圖 3/56 1



[(圖 22.B)]

圖 3/56 2



[(圖 22.C)]

圖 22.10

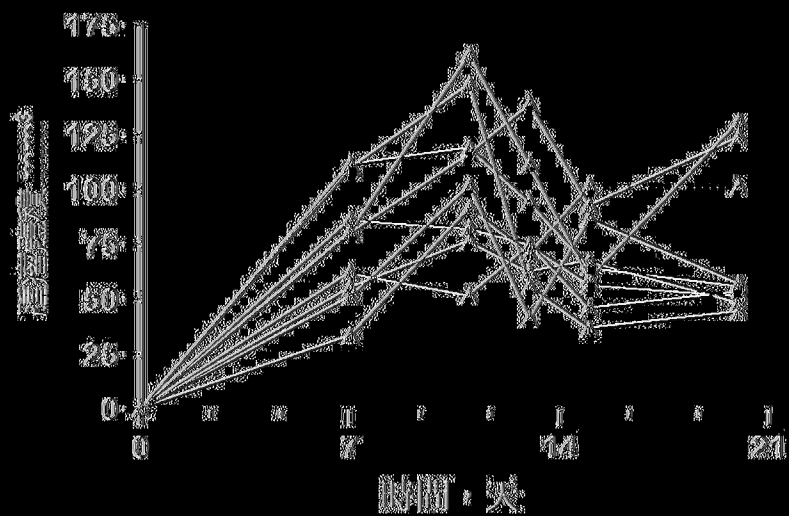


圖 22.11

媒劑

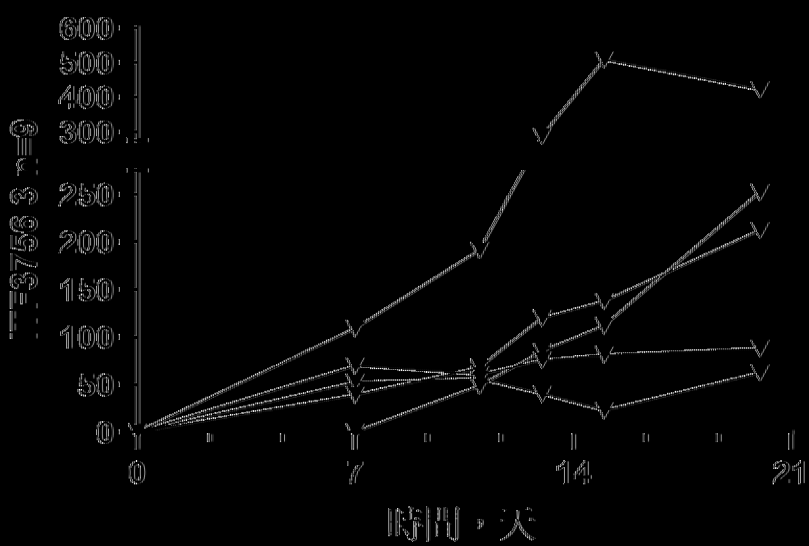
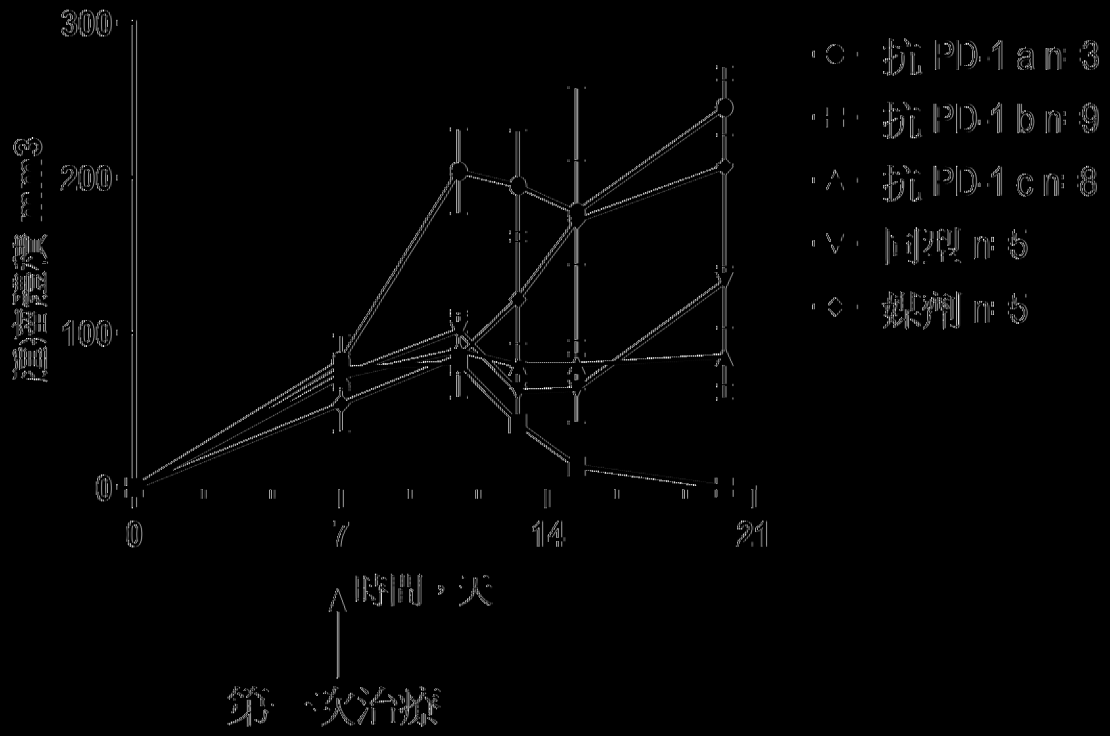


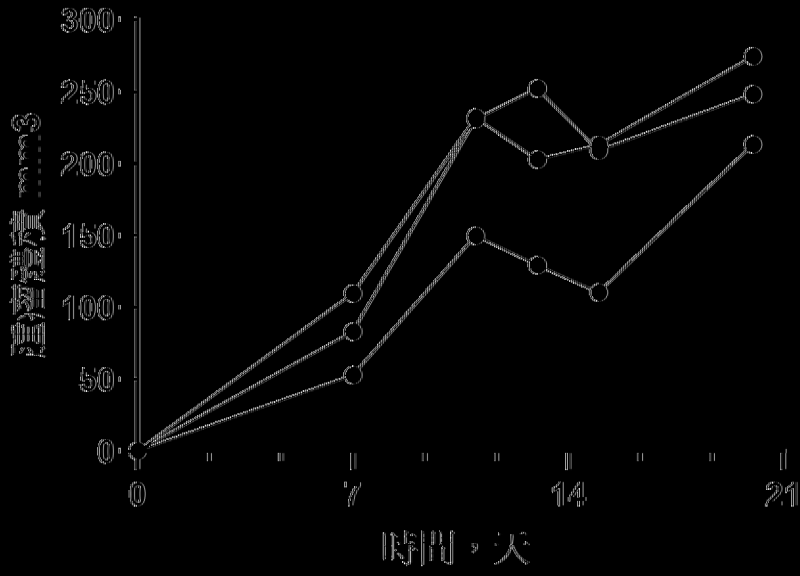
圖 22.12

抗PD-1



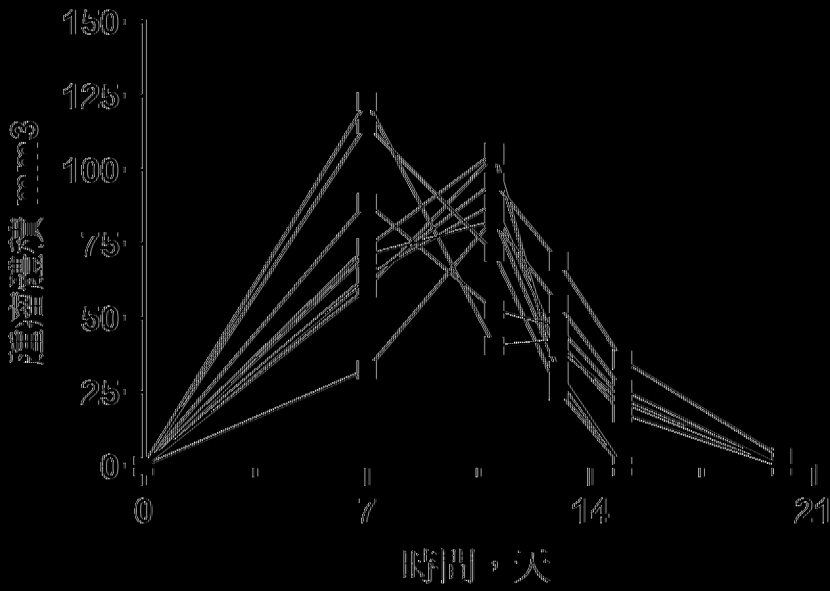
[(圖) 23A]

抗 PD.1 a



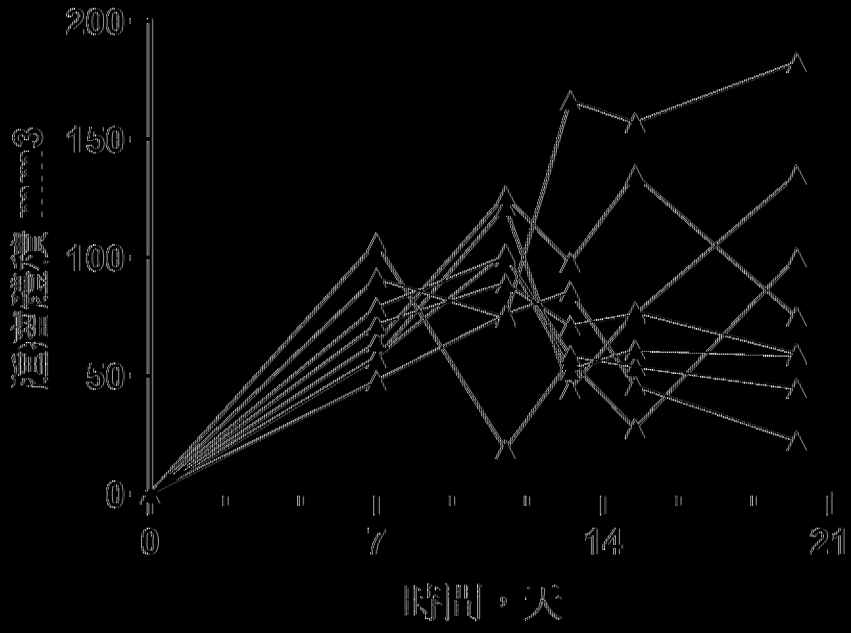
|(圖| 23B)|

抗 PD.1 b



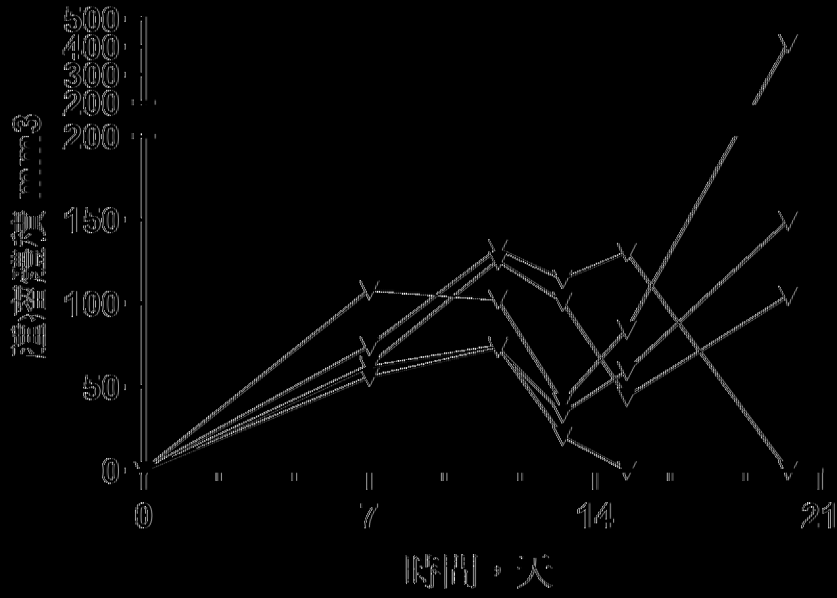
|(圖| 23C)|

抗 PD-1 c

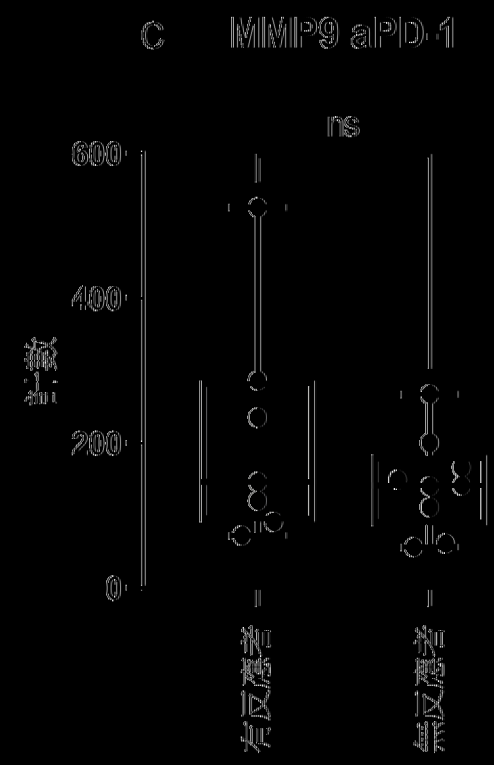
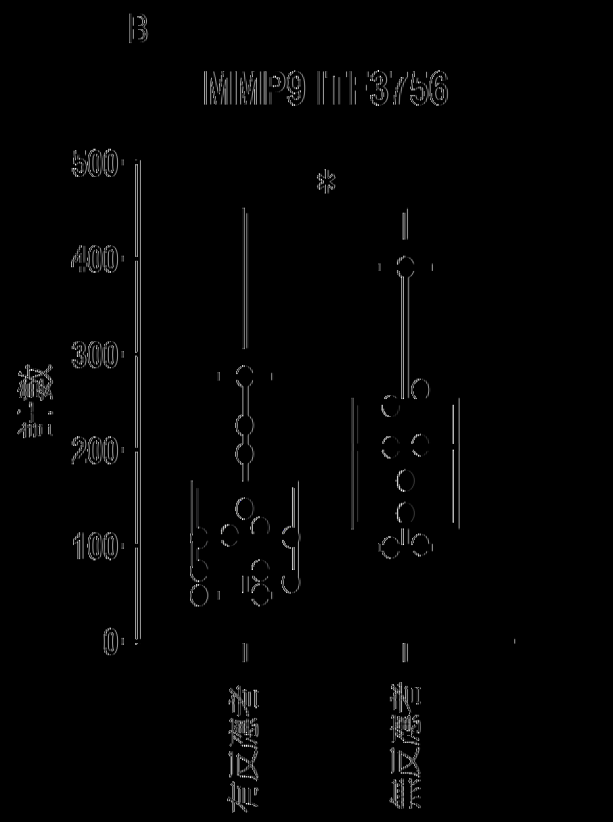
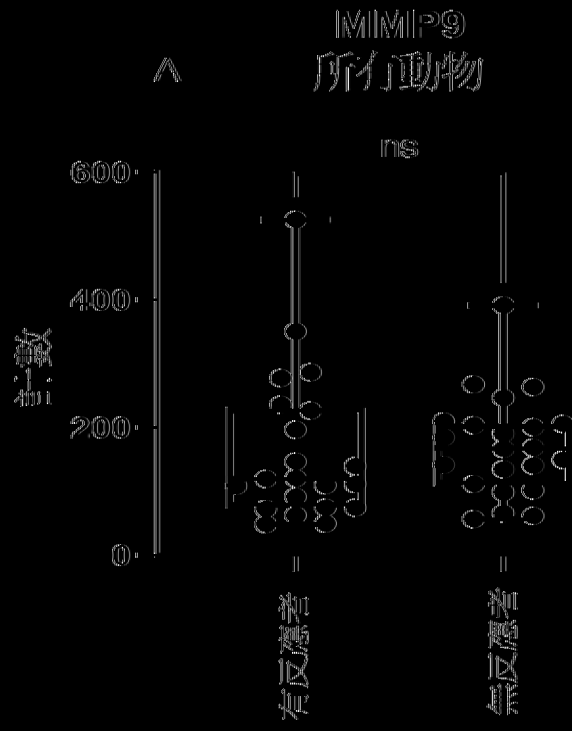


|(圖 23D)|

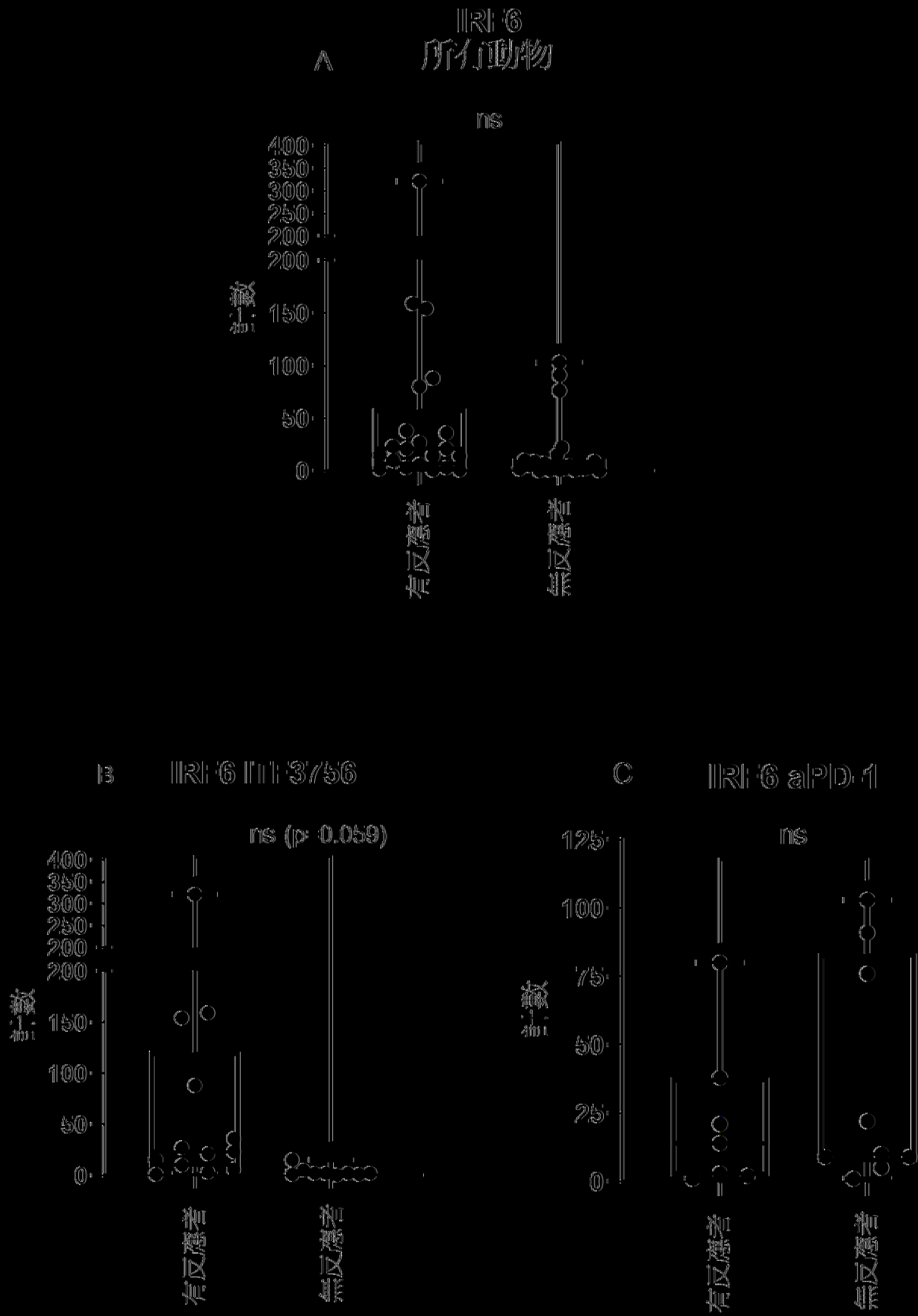
同型



|(圖 23E)|

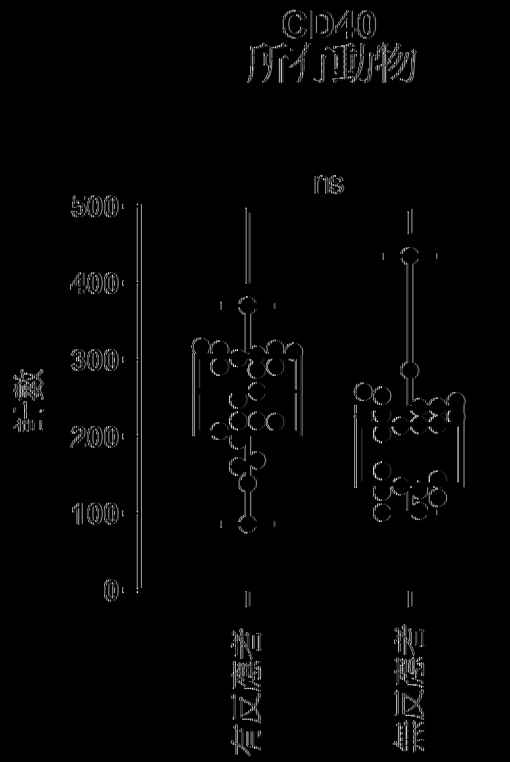


(註) 24A 24C

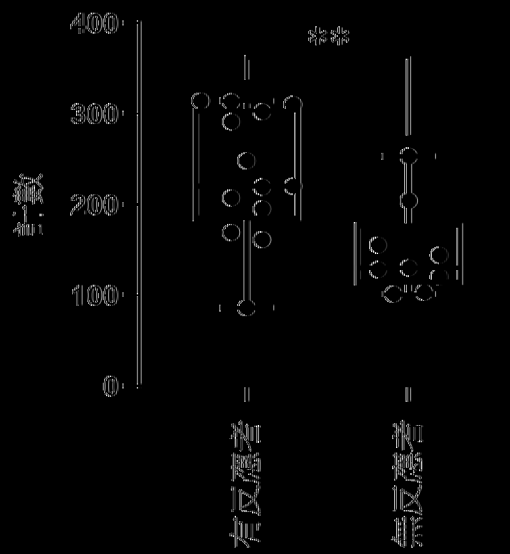


|(圖 2.5A-2.5C)|

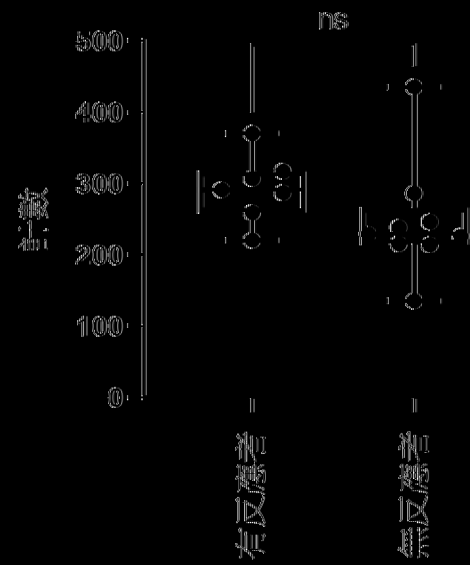
A



B CD40 Il13/56



C CD40 aIPD-1



|(圖 2.6A-2.6C)|