



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년01월14일
(11) 등록번호 10-1938431
(24) 등록일자 2019년01월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/428 (2006.01) A61K 31/4439 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-7031960
(22) 출원일자(국제) 2012년05월04일
심사청구일자 2017년04월24일
(85) 번역문제출일자 2013년12월02일
(65) 공개번호 10-2014-0029475
(43) 공개일자 2014년03월10일
(86) 국제출원번호 PCT/US2012/036589
(87) 국제공개번호 WO 2012/151523
국제공개일자 2012년11월08일
(30) 우선권주장
61/482,723 2011년05월05일 미국(US)
61/624,861 2012년04월16일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
KR1020080112380 A*
KR1020080112388 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
노파르티스 아게
스위스 4002 바젤
슬로안-케테링인스티튜트퍼캔서리서치
미국, 뉴욕10065, 뉴욕, 요크애버뉴1275
(72) 발명자
다니엘, 딜런
미국 94608-2916 캘리포니아주 에머리빌 호튼 스트리트 4560 노바티스 백신즈 앤드 다이아그노스틱스 인크.
조이스, 요한나
미국 10065 뉴욕주 뉴욕 에이피티, 4비 64번 스트리트 402이
서튼, 제임스
미국 94608-2916 캘리포니아주 에머리빌 호튼 스트리트 4560 노바티스 백신즈 앤드 다이아그노스틱스 인크.
(74) 대리인
양영준, 위혜숙

전체 청구항 수 : 총 8 항

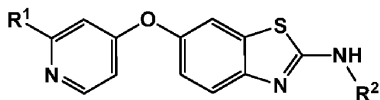
심사관 : 이형준

(54) 발명의 명칭 **뇌 종양의 치료를 위한 CSF-1R 억제제**

(57) 요약

본 발명은 뇌 종양, 특히 교모세포종을 치료하는데 사용하기 위한 하기 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염 및 상기 화합물을 함유하는 조성물을 제공한다. 본 발명은 효과적인 뇌 종양 치료법을 제공하고, 본원에 추가로 기술된 바와 같이 화학식 I의 화합물의 경구 투여에 의해 사용될 수 있다. 상기 방법을 사용하는 성공적인 치료법과 상관관계에 있는 유전자 서명 또한 개시한다:

<화학식 I>



상기 식에서,

R¹은 알킬 피라졸 또는 알킬 카르복스아미드이고, R²는 히드록시시클로알킬이다.

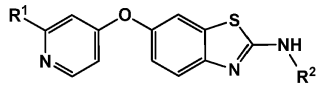
명세서

청구범위

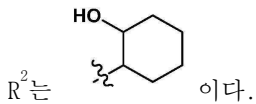
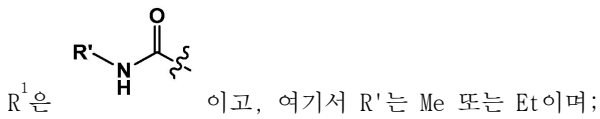
청구항 1

하기 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 포함하는, 포유동물 대상체에서 뇌 종양을 치료하기 위한 제약 조성물.

<화학식 I>

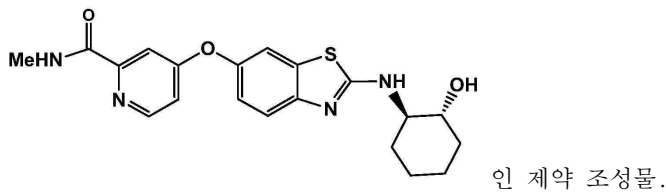


상기 식에서,



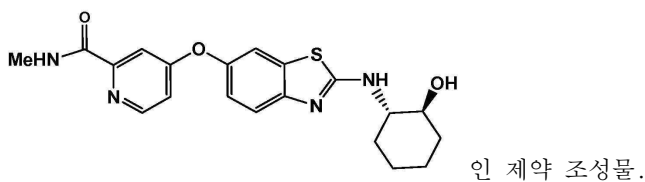
청구항 2

제1항에 있어서, 화학식 I의 화합물이



청구항 3

제1항에 있어서, 화학식 I의 화합물이



청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 뇌 종양이 신경교종인 제약 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 신경교종이 다형성 교모세포종인 제약 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 뇌 종양이 뇌 전이, 성상세포종, 핍지교종, 상의세포종 또는 혼합형 신경교종인 제약 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 화합물이 공동치료제와 함께 사용하기 위한 것으로 제제화되는 것인 제약 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 공동치료제가 항혈관신생제, 이리노테칸과 병용되거나 병용되지 않는 베바시주맙, 니트로소우레아, 플라틴, 알킬화제, 티로신 키나제 억제제, 우크라인 및 칸나비노이드로부터 선택되는 것인 제약 조성물.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

발명의 설명

기술 분야

배경 기술

- [0001] 뇌암 및 중추 신경계 암은 치료하기 가장 어려운 암 중 하나이다. 이러한 암을 앓는 환자에 대한 예후는 종양의 유형 및 위치 뿐만 아니라, 그의 발생 병기에 따라 달라진다. 많은 뇌암 유형의 경우, 증상 발병 후 평균 기대 수명은 수개월 또는 1년 또는 2년일 수 있다. 치료법은 주로 외과적 절제 및 방사선 요법으로 이루어지며; 화학요법 또한 사용되기는 하나, 아마도 대부분의 치료제가 혈액-뇌 장벽을 투과하지 못함에 따라 뇌 종양을 적절히 치료하지 못하기 때문에, 적합한 화학요법제의 범위에는 한계가 있다. 수술 및 방사선과 함께 공지된 화학요법제를 사용하는 것이 수술 및 방사선을 단독으로 사용하였을 때보다 생존 기간을 훨씬 더 오랜 기간으로 연장시키지는 못한다. 따라서, 뇌 종양을 위한 개선된 치료 옵션이 요구된다.
- [0002] 신경교종은 보편적인 유형의 뇌 종양이다. 이는 뉴런의 위치와 기능을 유지시켜 주는 신경교 세포 (이에, 그 명칭은 신경교종이다)로 이루어진 지지 뉴런 조직으로부터 유발된다. 신경교종은 그가 닮은 신경교 세포의 유형에 따라 분류되는데: 성상세포종 (교모세포종 포함)은 별 모양의 성상세포 신경교 세포를 닮았고; 핍지교종은 핍지교세포 신경교 세포를 닮았고; 상의세포종은 뇌에서 체액강의 내피를 형성하는 뇌실막 신경교 세포를 닮았다. 일부 경우에서, 종양은 이러한 세포 유형의 혼합형을 함유할 수 있고, 이로써 혼합형 신경교종으로 지칭될 수 있다.
- [0003] 뇌암에 대한 전형적인 현 치료법은 종양 조직 대부분을 외과적으로 절제하는 것인데, 이는 침습적 수술에 의해 또는 생검 또는 추출 방법에 의해 수행될 수 있다. 신경교종은 불규칙적으로 파종되는 경향이 있기는 하지만, 완전하게 제거하는 것은 매우 어렵다. 그 결과, 종양 제거 이후에 곧바로 재발이 거의 항상 일어난다. 방사선 요법 및/또는 화학요법은 외과적 절제와 조합하여 사용될 수 있지만, 이는 일반적으로는 단지 보통 정도로만 생존 기간을 연장시킬 뿐이다. 예를 들어, 최근 통계에 따르면, 미국에서 교모세포종 진단을 받은 환자 중 대략적으로 단 절반만이 심지어 현 표준 조합 치료법으로 치료를 받은 경우에도 진단 후 1여 년까지 살아남았고, 단 약 25%만이 2년 후까지 계속해서 살아남은 것으로 나타났다.
- [0004] 다형성 교모세포종 (GBM)은 가장 일반적인 성인 원발성 뇌 종양이며, 그의 치사율과, 현 치료 접근법에 대한 반응 부족으로 악명이 높다. 불행하게도, 최근에 치료 옵션에서의 실질적 개선은 없었으며, GBM 환자의 생존 가능성에 대해서는 최소한의 개선만이 이루어졌을 뿐이다. 따라서, 뇌암, 예컨대 신경교종의 치료법에 대한 개선이 시급히 요구되고 있다.
- [0005] 신경교종은 암 세포 그 자체 이외에도 뇌 실질 중 많은 다른 유형의 세포로 구성된 복합 조직 미세환경에서 발생한다. 종양 관련 대식세포 (TAM)는 존재하는 중요 기질 세포 유형 중 하나이며, 이는 대개 종양 조직 중의 세포 중 상당부를 차지한다. 그의 기원은 확실하지는 않다: 이들 TAM은 뇌에 상주하는 대식세포 집단인 소교세포로부터 기원하는 것일 수 있거나, 또는 주변부로부터 동원된 것일 수 있다.
- [0006] TAM은 조직 특이 방식으로 종양 개시 및 진행을 조절할 수 있다: 이는 일부 경우에는 암 발생을 억제시키는 것으로 보이지만, 현재까지 진행된 연구 중 대다수에서는 종양 진행을 증진시키는 것으로 나타났다. 실제로, 대식세포 침윤이 증가되어 있는 암 중 대략 80%에서 TAM 수준 상승은 공격성이 더 큰 질환 및 불량한 환자 예후와 관련이 있다. 인간 신경교종에서도 또한 진행성 종양 등급과 상관관계에 있는 TAM 개수가 현저히 증가되어 있으며, TAM은 전형적으로 신경교종에서 중요한 면역 세포 유형이라는 것이 여러 연구를 통해 밝혀졌다. 그러나, 신경교종발생에서 TAM의 기능에 관해서는 여전히 불충분하게 이해되고 있으며, 상기 세포를 표적화하는 것이 실

현 가능한 치료학적 전략법을 나타내는 것인지 여부도 현재는 알려져 있지 않다. 사실상, 일부 경우에는 동 일한 동소 신경교종 이식 모델에서 대식세포를 고갈시키기 위해 유사한 실험 전략법을 사용한 경우에서조차 종 양 성장에 대하여 반대되는 효과가 존재한다는 것이 문헌에 보고된 바 있다. 일부 경우에서, TAM에 의해 생산 된 TNF- α 또는 인테그린 $\beta 3$ 는 신경교종 성장 억제와 연루되어 있는 반면, 다른 보고에 따르면, CCL2 및 MT1-MMP는 종양 발생 및 침습의 증진제로서 제안된 바 있다.

[0007] CSF-1R 신호전달을 억제시키는 것이, 이종이식 경골내 골 종양을 비롯한, 여러 종양학적 맥락하에서 사용되어 온 신규한 번역상 관련된 접근법을 나타낸다. 뇌암 이외의 다른 일부 암은 종양 세포 그 자체를 직접적으로 표 적화하기보다는, 종양 세포와 관련이 있거나 또는 그를 지지하는 다양한 세포 유형에 영향을 미치는 화합물로 표적화되어 왔다. 예를 들어, PLX3397은 3가지 표적 (FMS, Kit, 및 Flt3-ITD)을 함께 공동으로 억제시키고, 대 식세포, 소교세포, 파골세포, 및 비만 세포를 비롯한 각종 세포 유형을 하향 조절시키는 것으로 보고되어 있다. PLX3397은 호지킨 림프종 치료를 위한 것으로 시험되었다. 그러나, PLX3397 문헌에 따르면, 호지킨 림프종은 각종 화학요법제에 대해 잘 반응하는 반면, 뇌 종양은 화학요법제에 대해 더욱 큰 내성을 띠며, 성공적으로 치 료되지 않았다. 본원에서 입증된 바와 같이, CSF-1R 억제제는 배양물 중에서의 교모세포종 세포의 증식에 대해 서는 어떤 직접적인 영향도 미치지 않고, 치료받은 동물의 종양 중의 대식세포의 개수도 감소시키지 못했다. 따라서, 놀랍게도, 본원에서 또한 입증된 바와 같이, CSF-1R 억제제는 생체내에서 뇌 종양의 성장을 효과적으로 억제시킬 수 있고, 진행 단계인 GBM의 종양 부피를 축소시킬 수 있고, 심지어는 외관상으로 일부 교모세포종을 근 절시킬 수도 있다.

발명의 내용

[0008] 본 발명의 실시양태의 개요

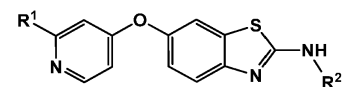
[0009] 본 발명은 뇌 종양, 특히 교모세포종이 CSF-1R의 억제제로 치료될 수 있다는 입증 내용을 기초로 한다. 본원에 기술된 CSF-1R 억제제의 유효성은, 비록 CSF-1R 억제제가 존재하는 TAM의 개수를 유의적으로 감소시키는 것으로 보이지는 않지만, TAM의 특정 활성을 억제시키는 것에 기인하는 것으로 여겨지며, 이는 또한 뇌 종양을 앓는 대 상체에서 효과적으로 혈액-뇌 장벽을 투과할 수 있는 상기 화합물의 입증된 능력과 함수 관계에 있을 수 있다. 본 방법은 뇌 종양, 특히 교모세포종 진단을 받은 환자에게 매우 필요한 신규의 치료학적 옵션을 제공한다.

[0010] 대식세포 콜로니 자극 인자 (M-CSF)로도 지칭되는 콜로니 자극 인자-1 (CSF-1)는 (c-FMS로도 알려져 있는) 그의 수용체 CSF-1R을 통해 신호를 전달함으로써 대식세포의 분화, 증식, 동원 및 생존을 조절한다. 다른 수용체 티 로신 키나제 억제제와 같이, 활성 부위에서의 ATP 결합에 대해 경쟁함으로써 수용체 인산화를 차단하는, CSF-1R 의 소분자 억제제가 개발되었다. 본 발명은 신경교종발생의 RCAS-PDGF-B-HA/네스틴-Tv-a;Ink4a/Arf^{-/-} 마우스 모델에서 예시되는 바와 같이, 혈액-뇌 장벽 (BBB)을 투과함으로써 신경교종에서 CSF-1R 신호전달을 차단하는, 강력한 효능을 지닌 선택적 CSF-1R 억제제를 이용한다. 상기의 유전자 조작된 신경교종 모델은 면역 능력이 있 는 환경에서 인간 GBM의 모든 특징들을 재현하는 바, 인간 GBM에 대한 모델로서 임상전 시험에 이상적이다. 상 기 모델은 인간 GBM, 및 특히 전신경 GBM과 매우 유사한 모델이기 때문에, 상기 모델에서의 효능은 인간 교모세 포종, 예컨대 다형성 교모세포종 및 혼합형 신경교종에 대해 미치는 임상 효능으로 해석할 수 있을 것으로 예상 된다.

[0011] 본 발명의 뇌를 투과할 수 있는 임의의 CSF-1R의 억제제로 실행될 수 있다. 상기와 같은 일부 화합물은 W02007/121484에 개시된 6-O-치환된 벤조옥사졸 및 벤조티아졸 화합물, 특히 상기 문헌에서 화학식 IIa 및 IIb 의 화합물, 및 본원에 개시된 화합물이다.

[0012] 한 측면에서, 본 발명은 포유동물 대상체에게 유효량의 하기 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염 을 투여하는 것을 포함하는, 포유동물 대상체에서 뇌 종양을 치료하는 방법을 제공한다:

[0013] <화학식 I>



[0014]

[0015] 상기 식에서,

[0016] R¹은 알킬 피라졸 또는 알킬 카르복스아미드이고;

[0017] R^2 는 히드록시시클로알킬이다.

[0018] 본 방법은 뇌 종양 진단을 받은 환자, 빈번하게는 인간 대상체를 치료하는 데 사용될 수 있다. 본 발명의 추가의 실시양태는 하기 기술되어 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] **도 1a**는 종양 조직에서 CD45 (범(pan)-백혈구 마커) 및 CD11b (골수성 세포 마커)에 대해 양성인 세포의 염색 비율 증가로서 측정된, 정상적인 뇌 및 교모세포종 조직에서 생 DAPI-양성 세포의 상대적인 비율을 보여주는 그래프이다. 형광 활성화된 세포 분류 (FACS) 데이터 또한 제시되어 있다.

도 1b는 정상적인 뇌 조직으로부터, 및 IV 등급의 교모세포종으로부터 유래된, CD68로 염색한 뇌 세포를 도시한 것이며, 종양 조직 중에 대식세포 침윤이 풍부하게 존재한다는 것을 보여주는 것이다. 실시예 1 참조.

도 1c는 하우스킵핑 유전자 유비퀴틴 C (Ubc)에 대해 상대적인 CD68, CSF-1R 및 CSF-1, 정상적인 뇌 조직에 대해 상대적인 GBM에 대한 mRNA 수준의 증가를 도시한 것이다.

도 1d는 종양 세포에 대해 상대적인 TAM 중의 CD11b, TVA, CSF-1 및 CSF-1R의 상대적인 양을 보여주는 것이다.

도 2는 마우스 코호트를 BLZ945로 처리한 이후의 여러 시점에서의 혈장, GBM을 함유하는, 뇌의 좌측 절반부로부터의 뇌 조직, 및 눈에 보이는 GBM은 없는, 같은 뇌의 우측 절반부로부터의 뇌 조직 중의 BLZ945의 양을 도시한 것이다.

도 3a는 골수 유래 대식세포 (BMDM) 중, CSF-1 자극 이후 일어나는 CSF-1R 인산화에 대해서 BLZ945에 의해 이루어지는 억제력을 보여주는 것이다.

도 3b는 비처리된 BMDM 세포의 집단 배가율을 보여주는 것이며, 이는 세포를 67 nM BLZ945로 처리하는 것이 상기 배가율에 대하여 CSF-1 자극 부재하에서와 같은 효과를 미친다는 것을 입증한다.

도 3c-3e는 Ink4a/Arf^{-/-} 마우스로부터의 BMDM 세포, CRL-2647 정상적인 마우스 뇌 세포 및 두 마우스 GBM 세포 배양물에 대한 증식률을 보여주는 것이다.

도 3f는 신경구의 총 개수 및 크기가 670 nM의 BLZ945에 의해서는 어떤 영향도 받지 않는다는 것을 보여준다.

도 4a는 비히클만 단독으로, 또는 비히클 + BLZ945로 처리된 RCAS-PDGF-B-HA/네스틴-Tv-a; Ink4a/Arf^{-/-} 마우스의 무증상 생존율을 도시한 것이다. 실시예 4 참조.

도 4b는 26주체의 연구 종료점에 처리 및 비처리된 마우스에 대한 종양 등급을 도시한 것이다. 모든 대조군 마우스는 III 또는 IV 등급 종양을 가졌다.

도 5a는 BLZ945로 처리한 처음 6일 동안의 처리된 동물 및 대조군 동물에 대한, MRI에 의해 측정된 종양 크기 데이터를 보여주는 것이다.

도 5b는 BLZ945를 이용한 투여 개시 후 처음 6일 동안 개별 코호트 마우스 (상단 그래프) 및 처리된 마우스 (하단 그래프)에 대한 종양 부피를 보여주는 것이다.

도 5c 및 5d는 거대 종양 (부피 >40 mm³)으로 시작된, BLZ945 처리된 동물의 종양 부피 (MRI로 측정)를 도시한 것이며, 이는 심지어 거대 종양인 경우에도, 거의 모든 대상체에서 종양 부피가 감소하였다는 것을 보여준다.

도 5e-5g는 실시예 5의 대조군 (5e) 및 처리군 (5f)에서 개별 동물의 종양 부피에 관한 데이터를 보여주는 것이고, 도 5g는 실시예 5에서 BLZ945로 처리된 거대 종양 대상체에 대한 종양 크기 데이터를 보여주는 것이다.

도 6: 첫번째 그래프는 실시예 5의 비히클, 처리군, '거대 종양' 군에서의 동물의 뇌 중 Olig2+ 세포의 비율을 보여주는 것이다. 두번째 그래프는 브로모데옥시우리딘 (BrdU) 표지화로 측정된, 활발하게 분열하는 종양 세포의 분율을 나타낸 것이다. 세번째 그래프는 절단형 카스파제 3 (CC3) 염색에 의해 측정된, 종양 세포 중의 아포토시스의 수준을 나타낸 것이며, 이는 BLZ945가 종양 세포의 아포토시스를 촉진시킨다는 것을 입증한다.

도 7a는 실시예 7의 유전자 발현 분석을 위해 세포의 FACS 분리에 사용된 단계를 보여주는 것이다.

도 7b는 처리된 및 비처리된 동물에 대한 SVM 유전자 서명(gene signature)을 보여주는 것이며, 이로부터 처리에 의해 상향 조절 및 하향 조절된 유전자를 확인할 수 있었다.

도 7c-7e는 M2-관련 유전자 및 EGR2 표적의 선택적인 상향 조절을 보여주는 것이다.

도 8a는 SVM 유전자 서명에서 차별적으로 발현된 유전자를 분류화하는 데 사용된 상향 조절 정도 및 통계적 관련성을 그래프로 도시한 것이다.

도 8b는 5개의 유전자 라쏘(Lasso) 회귀 서명을 보여주는 것이다.

도 8c는 TCGA 데이터 세트에서 전신경 GBM 종양에 대한 라쏘 유전자 서명 예측을 보여주는 것이다.

도 8d는 복합 데이터 세트에서 전신경 GBM 종양에 대한 라쏘 유전자 서명 예측을 보여주는 것이다.

도 8e는 TCGA 데이터 세트에서 전신경 GBM 종양에 대한 SVM 유전자 서명 예측을 보여주는 것이다.

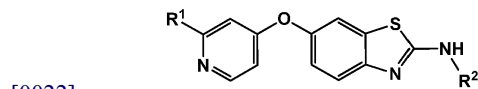
도 8f는 복합 데이터 세트에서 전신경 GBM 종양에 대한 SVM 유전자 서명 예측을 보여주는 것이다.

도 8g는 TCGA 및 복합 데이터 세트에 대한, 전신경, 고전형, 중간엽 및 신경 GBM 종양에 대한 BLZ945 유전자 서명 위험비를 도시한 것이고, 모든 데이터 전체에 걸쳐 전신경 GBM과의 통계적 상관성을 강조하는 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 본 발명은 뇌 종양의 치료에 사용하기 위한 화학식 I의 화합물, 및 뇌 종양의 치료를 위해 화학식 I의 화합물을 사용하는 방법을 제공한다. 화학식 I의 화합물은 하기 화학식을 가지며, 이는 이러한 화학식의 중성 화합물 뿐만 아니라, 제약상 허용되는 염들도 포함한다:

[0021] <화학식 I>



[0023] 상기 식에서,

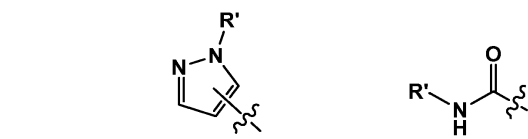
[0024] R¹은 알킬 피라졸 또는 알킬 카르복스아미드이고;

[0025] R²는 히드록시시클로알킬이다.

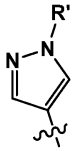
[0026] 본 발명의 범주 내의 구체적인 화합물은 추가로 하기에 기술한다.

[0027] 뇌 종양의 치료는 뇌 종양 성장 속도 억제 (종양 성장 저속화), 또는 뇌 종양 성장 역전 (즉, 종양 부피 축소), 또는 지속적인 종양 제거를 포함할 수 있으며, 이는 상기 종양을 앓는 마우스에 대한 본원의 치료법에 의해 입증되었다. 특히, 치료법은 교모세포종의 진행을 저속화시킬 수 있거나, 또는 진행을 역전시킬 수 있다. 별크한 뇌 종양을 제거하는 것을 비롯한 다른 치료법과 함께 사용될 수 있거나, 재성장을 저속화시키거나, 역전시키는 데, 또는 외과적 또는 생검 방법에 의한 뇌 종양 제거 이후 남아있는 종양성 조직의 부피 또는 매스를 축소시키는 데 사용될 수 있다. 화합물은 또한 다른 화학요법제와 함께 사용될 수 있다.

[0028] 화학식 I의 화합물은 R¹이 알킬-치환된 피라졸 또는 카르복스아미드, 예컨대 C₁-C₄ 알킬 피라졸, 또는 화학식 -C(O)NHR (여기서, R은 C1-C4 알킬기이다)의 카르복스아미드인 화합물을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 알킬기는 Me 또는 Et이다. 본 발명에서 사용하기 위한 특정의 바람직한 화합물은 하기에 개시되어 있다. 상기 방법 중 일부 실시양태에서, R¹은



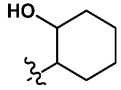
또는 이고, 여기서 R'는 Me 또는 Et이다. 바람직하게, 피라졸 고리는 4번 위치에 부착되어 있고, 즉,



이다.

[0030]

[0031] 상기 화합물에서, R²는 히드록시시클로헥실기, 예컨대 이같은

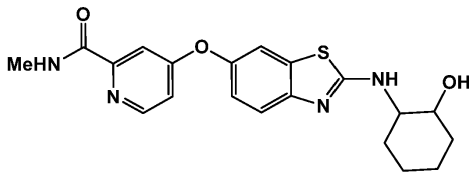


, 또는 2-히드록시시클로펜트-1-일기이다.

[0032]

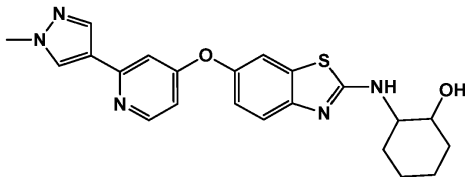
[0033] 구체적으로 바람직한 화합물로는 하기 화합물 중 임의의 것, 또는 이들 화합물 중 임의의 둘 이상의 것으로 이루어진 혼합물, 또는 이들 중 어느 하나의 제약상 허용되는 염을 포함한다:

[0034] <화학식 Ia>



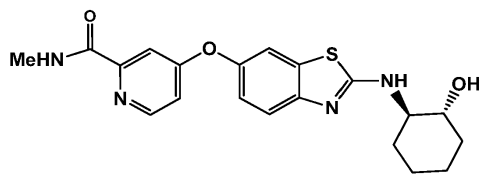
[0035]

[0036] <화학식 Ib>



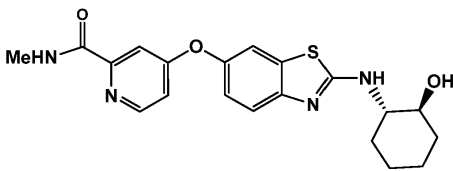
[0037]

[0038] <화학식 Ic>



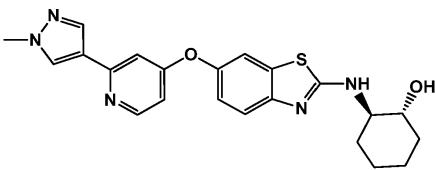
[0039]

[0040] <화학식 Id>



[0041]

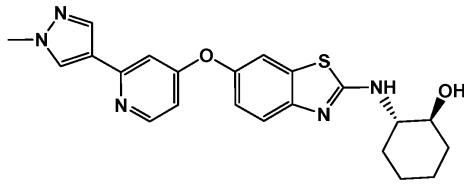
[0042] <화학식 Ie>



[0043]

[0044] 또는

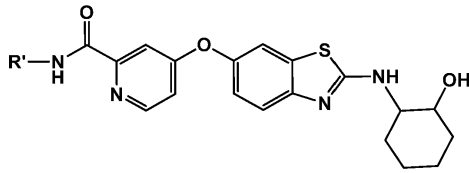
[0045] <화학식 If>



[0046]

[0047] 이들 화합물 및 그의 제약상 허용되는 염들은 각각 본 발명의 목적을 위해 바람직한 실시양태이다. 이러한 화합물의 바람직한 실시양태로는 또한 하기 화학식의 화합물을 포함한다:

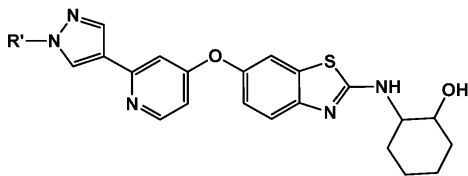
[0048] <화학식 Ig>



[0049]

[0050] 및

[0051] <화학식 Ih>



[0052]

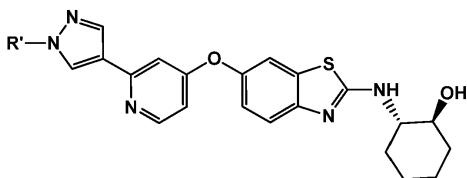
[0053] 상기 식에서,

[0054] R'는 Me, Et 또는 프로필, 바람직하게는 메틸이다. 상기 화합물의 구체적인 실시양태는 (R,R) 절대 입체화학 또는 (S,S) 절대 입체화학의 것일 수 있다.

[0055] 상기 화합물은 매우 유사한 그의 물리화학적 특성에 기초하여 BLZ945와 같이 혈액-뇌 장벽 투과를 보일 것으로 예상되며, 따라서 본 치료 방법에 사용하기에 적합하다.

[0056] 화학식 I의 화합물은 당업계에, 예를 들어, WO2007/121484에 공지되어 있고; 신경교종을 치료하는 그의 유용성 및 그의 혈액-뇌 장벽 투과는 이전에는 알려지지 않았었다. 화합물 1c는 BLZ945에 상응하는 것으로, 이는 본원에 기술된 시험관내 및 생체내 시험에 사용되었다.

[0057] 시클로헥실 고리에서 (1S,2S) 입체화학을 가지는 화학식 Ih의 화합물은 신규한 것이다. 이들 화합물은 CSF-1R을 매우 효과적으로 억제시킴과 동시에, 예상밖의 우수한 PDGFR β 억제제이다 (본원 데이터 참조). 따라서, 이러한 하기 화학식의 신규한 화합물이 본원에서 개시된 치료 방법의 유효성을 증가시킬 것으로 예상되는 이중 억제제 효과를 제공하는 본 발명의 또 다른 측면이 된다:



[0058]

[0059] 상기 식에서,

[0060] R'는 Me, Et 또는 프로필이다.

[0061] 화합물은 단독으로 사용될 수 있거나, 또는 하나 이상의 제약상 허용되는 부형제 또한 함유하고, 대개는 2종 이상의 제약상 허용되는 부형제를 함유하는 제약 조성물로 제제화될 수 있다. 제약상 허용되는 부형제는 전형적

으로 멸균된 것임을 이해할 것이다. 일부 적합한 부형제는 본원에 개시되어 있고; 일부 실시양태에서, 화합물은 캡티솔, 예컨대 20% 캡티솔을 포함하는 조성물로서 제제화된다.

[0062] 일부 실시양태에서, 뇌 종양은 뇌 전이, 정상세포종 (교모세포종 포함), 핍지교종, 상의세포종, 및 혼합형 신경교종으로부터 선택된다. 바람직한 실시양태에서, 뇌 종양은 신경교종, 특히, 다형성 교모세포종이다. 다른 실시양태에서, 뇌 종양은 뇌 전이, 즉 신체 다른 부위에서 기원한 암으로부터 유발된 전이성 종양이다.

[0063] 일부 실시양태에서, 환자는 교모세포종 환자이다. 구체적인 실시양태에서, 대상체는 전신경 교모세포종 진단을 받은 대상체이다 (문헌 [Verhaak, et al., *Cancer Cell* 17(1):98-110 (2010)] 참조). 교모세포종의 이러한 서브타입은 보다 젊은 대상체에서 발생하며, TP53, IDH1 및 PDGFRA의 돌연변이를 포함하는 경향이 있다. 2010년 버락(Verhaak) 등은 전신경 교모세포종 환자가 다른 서브타입 (고전형, 신경, 중간엽)에 비하여 공격적인 화학요법에 대해 반응성이 더 작다고 보고하였으며, 심지어는 상기와 같은 치료법이 이들 환자에게는 사용이 금지될 수 있다고도 제안한 바 있다. 본 방법은 본원에서 사용된 전신경 GBM 동물 모델에 의해 입증된 바와 같이, 전신경 교모세포종을 치료하는 데 특히 효과적이다. BLZ945로 치료받은 마우스의 TAM에서 발견되는 특이적인 유전자 서명은 생존 기간이 평균 생존 기간 중간값보다 더 긴 인간 전신경 교모세포종 환자의 것과 매치되는 것으로 나타났다; 교모세포종의 다른 서브타입을 앓는 환자와 비교하였을 때, 이러한 상관관계는 없었다. 따라서, 유전자 서명 정보를 사용함으로써 본원에 기술된 바와 같은 CSF-1R 억제제로 치료하기 위한 환자를 선별할 수 있거나, 또는 상기 치료법을 받은 대상체에 대한 예후를 평가할 수 있다.

[0064] 일부 실시양태에서, 본 방법은 종양 제거와 같은 다른 치료 방법 이전에 대상체를 치료하는 데 사용된다. 다른 실시양태에서, 본 방법은 외과적 또는 생검 방법에 의한 종양 제거와 같은 다른 치료 방법과 함께, 또는 방사선요법과 함께, 또는 종양 제거 및 방사선 요법 둘 모두와 함께 대상체를 치료하는 데 사용된다.

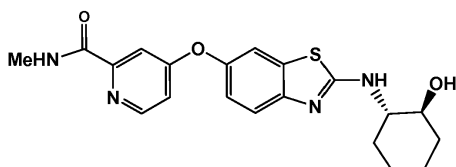
[0065] 임의로, 상기 개시된 화합물 및 방법과 함께 다른 화학요법제가 사용될 수 있다. 본 방법에서 사용하기에 적합한 추가의 화학요법제는 당업계에 교모세포종 치료용으로 알려져 있는 종래의 것이다. 상기와 같은 일부 화학요법제로는 항혈관신생제, 이리노테칸과 병용되거나 병용되지 않는 베바시주맙, 니트로소우레아, 예컨대 카르무스틴 (BCNU), 플라틴, 예컨대 시스-플래티늄 (시스플라틴), 알킬화제, 예컨대 테모졸로미드, 티로신 키나제 억제제 (게피티닙 또는 에를로티닙), 우크라인(Ukrain), 및 칸나비노이드를 포함한다. 이러한 추가의 치료제 (공동치료제)는 동시 투여에 의해, 공동치료제와 CSF-1R 억제제의 혼합에 의해, 또는 순차 투여에 의해 CSF-1R 억제제와 함께 동시에 사용될 수 있다. 바람직한 실시양태는 본원에 개시된 화학식 I의 화합물 (예컨대 화학식 Ia, Ib, Ic, Id, Ie, If, Ig 또는 Ih)로부터 선택되는 화합물을 테모졸로미드 또는 플라틴 화합물과 함께 조합하여 사용하는 것을 포함한다.

[0066] 추가로, 대식세포는 유방암의 경우, 치료학적 반응의 감소, 및 방사선 요법 이후 교모세포종 이식편에서의 혈관 재생 증가와 관련이 있다. 이러한 대식세포의 효과가 다른 요법의 효능을 감소시키기 때문에, 생체내에서 교모세포종에서의 대식세포 활성을 억제시키는 본 발명의 화합물은 다른 치료제 또는 방사선 요법과 함께 조합하여 사용될 때 상승작용 효과를 제공할 것으로 기대할 수 있다.

[0067] 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 방법은 화학식 Ic의 화합물을 이용하여 실시된다. 다른 실시양태에서, 본 방법은 화학식 Ic의 화합물이 아닌 다른 화학식 I의 화합물, 예컨대 본원에 개시된 다른 종을 이용하여 실시될 수 있다.

[0068] 일부 실시양태에서, 화학식 I의 화합물은 또한 하나 이상의 다른 표적을 억제시킴으로써 항종양 효과를 증진시킨다. 예를 들어, 하기 화학식 Id 및 If의 화합물:

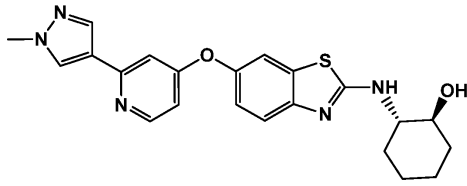
[0069] <화학식 Id>



[0070]

[0071] 및

[0072] <화학식 If>

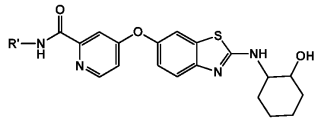


[0073]

[0074] 이 또한 본원에 기술된 것과 같은 전형적인 치료학적 투여량에서 달성되는 농도에서 PDGFR을 억제시킨다. 따라서, 이들 화합물은 이중 작용 기전이 필요한 경우에 사용될 수 있고, 상기 기술된 방법들 중 임의의 것에서 사용될 수 있다.

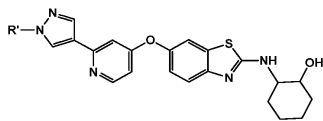
[0075] 화학식 Ig 및 Ih의 화합물의 예는 CSF-1R 및 PDGFR에 대한 상대적인 활성을 예시하는 하기 표에 포함되어 있다. 상기와 같은 화합물 다수가 공지되어 있으며 (W02007/066898 참조), 이러한 화합물을 제조하는 방법 또한 주지되어 있다. 화학식 I의 화합물은 하기 표에 제시된 바와 같이, 시클로헥실 고리에서의 입체화학과는 상관없이 CSF-1R에 대하여 큰 활성을 띤다. 다양한 이성질체들 중 S,S 이성질체는 또한 CSF-1R 뿐만 아니라, PDGFR-β에 대해서도 고도의 활성을 띠며, 따라서, 효능을 증진시키는 두 기전에 의해 신경교종에 대하여 작용할 수 있다.

[0076] <화학식 Ig>



[0077]

[0078] <화학식 Ih>



[0079]

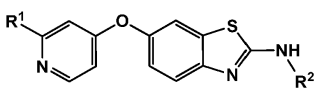
화합물	R'	입체화학	CSF-1R IC-50 (μM)	PDGFR-β IC-50 (μM)
Ig-A	Me	(1R,2R)	0.001	5.9
Ig-B	Et	(1R,2R)	0.006 μM	13.9
Ig-C	Pr	(1R,2R)	0.008	7.7
Ig-D	Me	(1S,2S)	0.0008	0.048
Ig-E	Me	(1R,2S)	0.006	6.6
Ig-F	Me	(1S,2R)	0.001	0.78
Ih-A	Me	(1R,2R)	0.0009	0.74
Ih-B	Et	(1R,2R)	0.003	1.7
Ih-C	Pr	(1R,2R)	0.007	1.5
Ih-D	Me	(1S,2S)	0.001	0.02
Ih-E	Me	(1S,2R)	0.002	0.63

[0080]

[0081] 하기 열거된 실시양태가 본 발명을 대표한다:

[0082] 1. 포유동물 대상체에게 유효량의 하기 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 투여하는 것을 포함하는, 포유동물 대상체에서 뇌 종양을 치료하는 방법.

[0083] <화학식 I>



[0084]

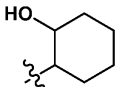
[0085] 상기 식에서,

[0086] R¹은 알킬 피라졸 또는 알킬 카르복사미드이고;

[0087] R²는 히드록시시클로알킬이다.



[0088] 2. 제1 실시양태에 있어서, R¹이  또는  이고, 여기서 R'는 Me 또는 Et인 방법.

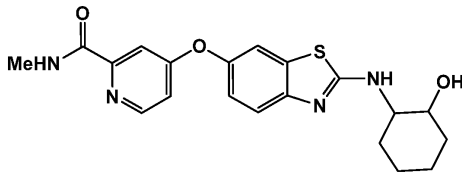
[0089] 3. 제1 또는 제2 실시양태에 있어서, R²가  인 방법.

[0090] 4. 제1 내지 제3 실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 뇌 종양이 신경교종, 바람직하게는 전신경 교모세포종인 방법.

[0091] 5. 제4 실시양태에 있어서, 신경교종이 다형성 교모세포종인 방법.

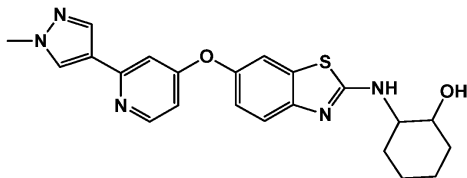
[0092] 6. 제1 내지 제3 실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 뇌 종양이 뇌 전이, 정상세포종 (교모세포종 포함), 핍지교종, 상의세포종, 또는 혼합형 신경교종인 방법.

[0093] 7. 제1 내지 제6 실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 화학식 I의 화합물이



[0094]

[0095] 또는

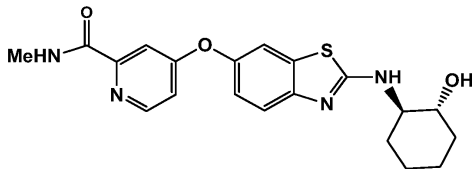


[0096]

[0097] 또는 그의 제약상 허용되는 염;

[0098] 또는 이들 중 하나의 단리된 입체이성질체인 방법.

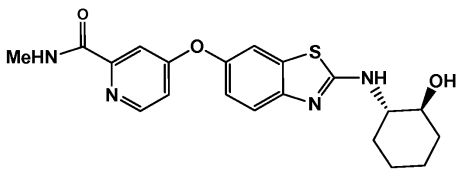
[0099] 8. 제7 실시양태에 있어서, 화학식 I의 화합물이



[0100]

인 방법.

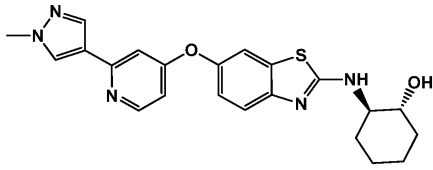
[0101] 9. 제7 실시양태에 있어서, 화학식 I의 화합물이



[0102]

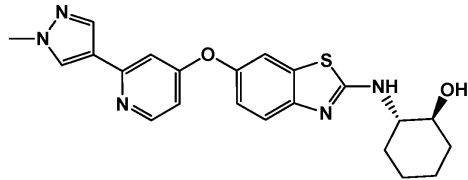
인 방법.

[0103] 10. 제7 실시양태에 있어서, 화학식 I의 화합물이



[0104] 인 방법.

[0105] 11. 제7 실시양태에 있어서, 화학식 I의 화합물이



[0106] 인 방법.

[0107] 12. 제1 내지 제11 실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 대상체에게 유효량의 추가의 암 치료제, 항혈관신 생제, 이리노테칸과 병용되거나 병용되지 않는 베바시주맙, 니트로소우레아, 예컨대 카르무스틴 (BCNU), 플라틴, 예컨대 시스-플래티넘 (시스플라틴), 알킬화제, 예컨대 테모졸로미드, 티로신 키나제 억제제 (게피티닙 또는 에틀로티닙), 우크라인, 및 칸나비노이드를 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

[0108] 13. 제1 내지 제12 실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 화학식 I의 화합물을 경구 투여하는 것인 방법.

[0109] 14. 제1 내지 제13 실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 대상체에게 투여하는 화학식 I의 화합물의 양이 약 50 mg/kg/일 내지 약 500 mg/kg/일, 또는 5 내지 500 mg/kg, 또는 100 내지 300 mg/kg/일인 방법.

[0110] 15. 제1 내지 제14 실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 대상체가 전신경 교모세포종을 앓는 것인 방법.

[0111] 16. 제1 내지 제15 실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 대상체가 대상체의 PDGF 또는 PDGFR 신호전달 수준이 상승되어 있기 때문에 선택된 것인 방법.

[0112] 17. 제1 내지 제16 실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 대상체를 동시에 PDGFR 억제제로 치료하거나, 또는 PDGFR 억제제로서 나노몰 이하(sub-nanomolar)의 활성을 가지는 CSF-1R 억제제, 예컨대 화합물 Id 또는 If로 치료하는 것인 방법.

[0113] 18. 제1 내지 제17 실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 대상체가 인간인 방법.

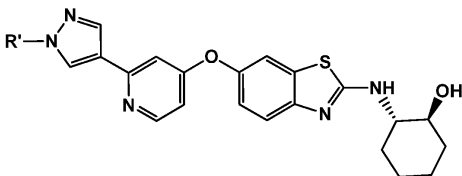
[0114] 19. 뇌 종양을 치료하는데 사용하기 위한 제1 실시양태의 화합물.

[0115] 20. 제19 실시양태에 있어서, 뇌 종양이 교모세포종인 화합물.

[0116] 21. 제20 실시양태에 있어서, 교모세포종이 전신경 교모세포종인 화합물.

[0117] 22. 제20 실시양태에 있어서, 공동치료제와 함께 사용하기 위한 것으로 제제화되는 화합물.

[0118] 23. 하기 화학식의 화합물.



[0119] 상기 식에서,
[0120]

[0121] R'는 Me, Et 또는 프로필이다.

[0122] 22. 제23 실시양태에 있어서, R'가 Me인 화합물.

[0123] 25. 제23 또는 제24 실시양태의 화합물 및 하나 이상의 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 조성물.

[0124] 본원에서 사용되는 바, "염" 또는 "염들"이라는 용어는 본 발명의 화합물의 산 부가 염 또는 염기 부가 염을 의

미한다. "염들"은 특히 "제약상 허용되는 염들"을 포함한다. "제약상 허용되는 염들"이라는 용어는 본 발명의 화합물의 생물학적 유효성 및 특성을 보유하고, 전형적으로는 생물학상 또는 다른 방식으로 비바람직하지는 않은 염들을 의미한다.

[0125] 제약상 허용되는 산 부가 염들은 무기산 및 유기산으로 형성될 수 있으며, 예컨대 아세테이트, 아스파르테이트, 벤조에이트, 베실레이트, 브로마이드/히드로브로마이드, 비카르보네이트/카르보네이트, 비술피이트/술피이트, 캄포르술포네이트, 클로라이드/히드로클로라이드, 클로르테오필로네이트, 시트레이트, 에탄디술포네이트, 푸마레이트, 글루셀레이트, 글루코네이트, 글루코로네이트, 히푸레이트, 히드로아이오다이드/아이오다이드, 이세티오네이트, 락테이트, 락토비오네이트, 라우릴술포이트, 말레이트, 말레에이트, 말로네이트, 만델레이트, 베실레이트, 메틸술포이트, 나프토에이트, 납실레이트, 니코티네이트, 니트레이트, 옥타데카노에이트, 올레이트, 옥살레이트, 팔미테이트, 파모에이트, 포스페이트/히드로젠 포스페이트/디히드로젠 포스페이트, 폴리갈락투로네이트, 프로피오네이트, 스테아레이트, 숙시네이트, 술폰살리실레이트, 타르트레이트, 토실레이트 및 트리플루오로아세테이트 염들이 있다.

[0126] 염들을 유도할 수 있는 무기산으로는 예를 들어, 염산, 브로민화수소산, 황산, 질산, 인산 등을 포함한다.

[0127] 염들을 유도할 수 있는 유기산으로는 예를 들어, 아세트산, 프로피온산, 글리콜산, 옥살산, 말레산, 말론산, 숙신산, 푸마르산, 타르타르산, 시트르산, 벤조산, 만델산, 메탄술폰산, 에탄술폰산, 톨루엔술폰산, 술폰살리실산 등을 포함한다. 제약상 허용되는 염기 부가 염들은 무기 및 유기 염기로 형성될 수 있다.

[0128] 염들을 유도할 수 있는 무기 염기로는 예를 들어, 암모늄 염들 및 주기율표의 I열 내지 XII열로부터의 금속을 포함한다. 특정 실시양태에서, 염들은 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘, 마그네슘, 철, 은, 아연 및 구리로부터 유도되고; 특히, 적합한 염들로는 암모늄, 칼륨, 나트륨, 칼슘 및 마그네슘 염들을 포함한다.

[0129] 염들을 유도할 수 있는 유기 염기로는 예를 들어, 1급, 2급, 및 3급 아민, 천연적으로 발생된 치환된 아민을 비롯한 치환된 아민, 시클릭 아민, 염기성 철 교환 수지 등을 포함한다. 특정 유기 아민으로는 이소프로필아민, 벤즈아민, 콜리네이트, 디에탄올아민, 디에틸아민, 리신, 메글루민, 피페라진 및 트로메타민을 포함한다.

[0130] 본 발명의 제약상 허용되는 염들은 종래의 화학 방법에 의해 제조될 수 있다. 일반적으로, 상기 염들은 상기 화합물의 유리 산 형태를 화학량론적 양의 적절한 염기 (예컨대 Na, Ca, Mg, 또는 K 히드록시드, 카르보네이트, 비카르보네이트 등)와 반응시킴으로써, 또는 상기 화합물의 유리 염기 형태를 화학량론적 양의 적절한 산과 반응시킴으로써 제조될 수 있다. 상기 반응은 전형적으로 물 중 또는 유기 용매 중, 또는 상기 둘의 혼합물 중에서 수행된다. 일반적으로, 실행가능한 경우, 비수성 매질, 예컨대 에테르, 에틸 아세테이트, 에탄올, 이소프로판올, 또는 아세토니트릴을 사용하는 것이 바람직하다. 추가의 적합한 염들에 관한 목록은 예컨대 문헌 [REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 20th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., (1985)]; 및 [HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL SALTS: PROPERTIES, SELECTION, AND USE by Stahl and Wermuth (Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2002)]에서 살펴볼 수 있다.

[0131] 본원에서 제공하는 임의의 화학식은 표지되지 않은 형태 뿐만 아니라, 동위원소로 표지된 형태의 화합물도 나타내는 것으로 한다. 동위원소로 표지된 화합물은 본원에서 제공된 화학식으로 표시되는 구조를 가지되, 단, 예외적으로, 하나 이상의 원자가 선택된 원자량 또는 질량수를 가지는 원자로 대체되어 있는 구조를 가진다. 본 발명의 화합물 내로 혼입될 수 있는 동위원소의 예로는 수소, 탄소, 질소, 산소, 인, 플루오린, 및 염소의 동위원소, 예컨대 각각 ²H, ³H, ¹¹C, ¹³C, ¹⁴C, ¹⁵N, ¹⁸F, ³¹P, ³²P, ³⁵S, ³⁶Cl, ¹²⁵I를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 화합물은 표지되지 않은 것이며, 즉, 상기 화합물은 모든 원자를 대략적으로 천연의 동위원소 존재비로 포함한다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 화합물은 화학식 I의 화합물 중의 한 원자에 대하여 풍부한 비-천연 동위원소를 선택적으로 혼입시킴으로써 표지된다. 본 발명은 본원에서 정의된 바와 같은 다양한 동위원소로 표지된 화합물, 예를 들어, 방사성 동위원소, 예컨대 ³H 및 ¹⁴C가 존재하는 것, 또는 비-방사성 동위원소, 예컨대 ²H 및 ¹³C가 존재하는 것을 포함한다. 상기와 같은 동위원소로 표지된 화합물은 대사 연구 (¹⁴C 이용), 반응 속도론 연구 (예를 들어, ²H 또는 ³H 이용), 검출 또는 영상화 기법, 예컨대 양전자 방출 단층촬영 (PET) 또는 단일-광자 방출 컴퓨터 단층촬영 (SPECT) (약물 또는 기질 조직 분포 검정 포함), 또는 환자의 방사선 치료에 유용하다. 특히, ¹⁸F 또는 표지된 화합물은 특히 PET 또는 SPECT 연구에 바람직할 수 있다. 동위원소로 표지된 화학식 I의 화합물은 일반적으로 예를 들어, 미국 특허 공개 번호 US2008/0045528 (WO2007/121484)의 화학식 I의 화합물의 합성에 관한 설명을 고려하여 당업자에게 공지된 종래 기법에 의해 제조할 수 있다. BLZ945 뿐만

아니라, 그의 이성질체 중 몇몇 이성질체 또한 상기 문헌에 기술되어 있다. 상기 문헌의 실시예 173 및 174에는 1R,2R-아미노시클로헥산을 사용하여 피라졸 화합물 Ie를 합성하는 것이 기술되어 있으며, 이는 표지 또는 표지되지 않은 다른 화학식 I의 피라졸 화합물 합성을 위해 적합화될 수 있다. 동일 공개 문헌상의 163페이지에는 1R,2R- 및 1S,2S-아미노시클로헥산을 둘 모두의 합성이 기술되어 있으며, 이를 실시예 173의 방법으로 치환시킴으로써 표지 또는 표지되지 않은 If 및 화학식 I의 다른 화합물을 제조할 수 있다.

[0132] 추가로, 중동위원소, 특히, 중수소 (즉, ²H 또는 D)로 치환하면, 대사 안정성이 증가함에 따라, 특정의 치료학상 이점을 얻을 수 있으며, 예를 들어, 생체내 반감기가 증가하거나, 투여량 요건이 축소되거나, 치료 지수가 개선될 수 있다. 이와 관련하여, 중수소는 화학식 I의 화합물의 치환기인 것으로 간주됨을 이해하여야 한다. 상기와 중동위원소, 구체적으로 중수소의 농도는 동위원소 농축 계수에 의해 정의될 수 있다. 본원에서 사용되는 바, "동위원소 농축 계수"라는 용어는 동위원소 존재비와 명시된 동위원소의 천연 존재비 사이의 비를 의미한다. 본 발명의 화합물에서 치환기가 중수소인 것으로 제시된 경우, 상기 화합물의 각 지정된 중수소 원자에 대한 동위원소 농축 계수는 3,500 이상 (각 지정된 중수소 원자에서 52.5%의 중수소 혼입), 4,000 이상 (60%의 중수소 혼입), 4,500 이상 (67.5%의 중수소 혼입), 5,000 이상 (75%의 중수소 혼입), 5,500 이상 (82.5%의 중수소 혼입), 6,000 이상 (90%의 중수소 혼입), 6,333.3 이상 (95%의 중수소 혼입), 6,466.7 이상 (97%의 중수소 혼입), 6,600 이상 (99%의 중수소 혼입), 또는 6,633.3 이상 (99.5%의 중수소 혼입)이다.

[0133] 본원에서 사용되는 바, "제약상 허용되는 부형제"라는 용어는 당업자에게 알려져 있는 바와 같이 (예를 들어, 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289-1329] 참조), 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 코팅제, 계면활성제, 항산화제, 보존제 (예컨대 항박테리아제, 항진균제), 등장제, 흡수 지연제, 염, 보존제, 약물 안정제, 결합제, 부형제, 붕해제, 운환제, 감미제, 향미제, 염료 등 및 이들의 조합을 포함한다. 임의의 종래의 담체가 활성 성분과 비상용성인 경우가 아닌 한, 치료제 또는 제약 조성물 중에서의 그의 용도가 고려된다.

[0134] 본 발명의 화합물의 "치료 유효량"이라는 용어는 대상체의 생물학적 또는 의학적 반응, 예를 들어, 효소 또는 단백질 활성의 감소 또는 억제, 증상을 호전시키거나, 병증을 경감시키거나, 질환 진행을 저속화 또는 지연시키거나, 또는 질환을 예방하거나 하는 본 발명의 화합물의 양을 의미한다. 한 비-제한적인 실시양태에서, "치료 유효량"이라는 용어는 대상체에게 투여되었을 때, (1) (i) CSF-1R에 의해 매개되거나, 또는 (ii) CSF-1R 활성화와 관련되거나, 또는 (iii) CSF-1R의 (정상 또는 비정상적인) 활성을 특징으로 하는 병증, 또는 장애, 또는 질환을 적어도 부분적으로 경감시키고/거나, 억제시키고/거나, 예방하고/거나, 호전시키는 데 효과적이거나; 또는 (2) CSF-1R의 활성을 감소시키거나 또는 억제시키는 데 효과적이거나; 또는 (3) CSF-1R의 발현을 감소시키거나 또는 억제시키는 데 효과적인 본 발명의 화합물의 양을 의미한다. 또 다른 비-제한적인 실시양태에서, "치료 유효량"이라는 용어는 세포, 또는 조직, 또는 비-세포 생물학적 물질, 또는 배지에 투여되었을 때, CSF-1R의 활성을 적어도 부분적으로 감소시키거나 또는 억제시키는 데 효과적이거나; 또는 CSF-1R의 발현을 적어도 부분적으로 감소시키거나 또는 억제시키는 데 효과적인 본 발명의 화합물의 양을 의미한다. 상기의 CSF-1R에 대한 실시양태에서 설명된 바와 같이 "치료 유효량"이라는 용어가 의미하는 것은 같은 의미로 임의의 다른 관련 단백질/펩티드/효소, 예컨대 PDGFR 등에도 적용된다.

[0135] 본원에서 사용되는 바, "대상체"라는 용어는 동물을 의미한다. 전형적으로, 동물은 포유동물이다. 대상체는 또한 예를 들어, 영장류 (예컨대 인간, 수컷 또는 암컷), 소, 양, 염소, 말, 개, 고양이, 토끼, 래트, 마우스, 어류, 조류 등을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 대상체는 영장류이다. 바람직한 실시양태에서, 대상체는 인간이다.

[0136] 본원에서 사용되는 바, "억제시키다," "억제" 또는 "억제시키는"이라는 용어는 주어진 병증, 증상, 또는 장애, 또는 질환을 감소 또는 저해시키거나, 또는 생물학적 활성 또는 과정의 기준 활성을 유의적으로 감소시키는 것을 의미한다.

[0137] 본원에서 사용되는 바, 임의의 질환 또는 장애를 "치료하다," "치료하는," 또는 "치료"라는 용어는 한 실시양태에서, 질환 또는 장애를 호전시키는 (즉, 상기 질환, 또는 그의 임상 증상들 중 하나 이상의 발생을 저속화 또는 정지 또는 감소시키는) 것을 의미한다. 또 다른 실시양태에서, "치료하다," "치료하는," 또는 "치료"란 환자가 인식하지 못할 수도 있는 것을 비롯한, 하나 이상의 신체상의 파라미터를 경감 또는 호전시키는 것을 의미한다. 또 다른 실시양태에서, "치료하다," "치료하는," 또는 "치료"란 신체적으로 (예컨대 인식이 가능한 증상의 안정화), 생리학적으로 (예컨대 신체상의 파라미터의 안정화), 또는 그 둘 모두로 질환 또는 장애를 조절하는 것을 의미한다. 또 다른 실시양태에서, "치료하다," "치료하는," 또는 "치료"란 질환 또는 장애의 발병 또는

발생 또는 진행을 예방 또는 지연시키는 것을 의미한다. 뇌 종양과 관련하여, '치료하는'이란 전형적으로 종양의 성장, 또는 벌크한 종양을 제거한 이후의 종양의 재성장 속도를 저속화시키거나, 또는 종양, 또는 벌크한 종양을 제거한 이후의 종양 잔류물의 크기를 축소시키는 것을 포함한다.

- [0138] 본원에서 사용되는 바, 대상체는 상기 대상체가 치료로부터 생물학적으로, 의학적으로, 또는 삶의 질에 있어서 이익을 얻게 된다면, 상기 치료를 "필요로 하는" 것이다. 전형적으로, 대상체는 뇌 종양, 빈번하게는 교모세포종 형태, 및 바람직하게는 다형성 교모세포종 진단을 받은 대상체이다.
- [0139] 본원에서 사용되는 바, 본 발명과 관련하여 (특히 특허청구범위와 관련하여) 사용되는 "하나"("a," "an"), "그" 및 유사 용어는 본원에서 달리 언급되지 않거나, 문맥상 뚜렷이 모순되지 않는 한, 단수 및 복수 형태 둘 모두를 포함하는 것으로 해석되어야 한다.
- [0140] 본원에 기술된 방법들은 모두 본원에서 달리 언급되지 않거나, 문맥상 뚜렷이 모순되지 않는 한, 임의의 적합한 순서로 수행될 수 있다. 본원에서 제공되는 임의의 및 모든 예시, 또는 예시적 표현 (예컨대 "예컨대")을 사용하는 것은 단지 본 발명을 더욱 명확하게 하기 위한 것이며, 다르게 청구되는 본 발명의 범주에 대하여 제한하는 것이 아니다.
- [0141] 일부 실시양태에서, 본 발명은 본 발명의 화합물 및 제약상 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는 제약 조성물을 이용한다. 제약 조성물은 특정 투여 경로용으로, 예컨대 경구 투여, 비경구 투여, 및 직장 투여 등의 용도로 제제화될 수 있다. 추가로, 본 발명의 제약 조성물은 고체 형태로 (제한없이, 캡슐제, 정제, 환제, 과립제, 분제 또는 좌제 포함) 또는 액체 형태로 (제한없이, 액제, 현탁제, 또는 에멀전 포함) 구성될 수 있다. 제약 조성물은 예컨대 멸균과 같이, 종래의 제약 방식으로 작업될 수 있고/거나, 종래의 불활성 희석제, 윤활제, 또는 완충화제 뿐만 아니라, 아주반트, 예컨대 보존제, 안정제, 습윤제, 유화제 및 완충제를 함유할 수 있다.
- [0142] 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 하나 이상의 추가의 화학요법제, 예컨대 테모졸로미드를 유효량으로 포함한다.
- [0143] 전형적으로, 제약 조성물은 활성 성분을 하나 이상의 부형제, 예컨대 (본원 실시예에서 사용된) 캡티솔, 하기 중 하나의 것과 함께 포함하는 정제 또는 젤라틴 캡슐제이다:
- [0144] a) 희석제, 예컨대 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 만니톨, 소르비톨, 셀룰로스 및/또는 글리신;
- [0145] b) 윤활제, 예컨대 실리카, 탭컴, 스테아르산, 그의 마그네슘 또는 칼슘 염, 및/또는 폴리에틸렌글리콜; 정제의 경우에는 또한
- [0146] c) 결합제, 예컨대 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 트라가칸트, 메틸셀룰로스, 나트륨 카르복시메틸셀룰로스 및/또는 폴리비닐피롤리돈; 원하는 경우;
- [0147] d) 담체, 예컨대 공용매화 물질, 예컨대 캡티솔, PEG, 글리신, 시클로텍스트린 등을 함유하는 수성 비히클;
- [0148] e) 붕해제, 예컨대 전분, 아가, 알긴산 또는 그의 나트륨 염, 또는 발포제 혼합물; 및/또는
- [0149] f) 흡수제, 착색제, 향미제 및 감미제.
- [0150] 정제는 당업계에 공지된 방법에 따라 필름 코팅 또는 장용 코팅될 수 있다.
- [0151] 바람직하게, 화합물 또는 조성물은 정제 또는 캡슐제로서, 예를 들어, 또는 임의로 예컨대 캡슐제와 같이, 단일 투여 용기에 패키징된 화학식 I의 화합물의 액제 또는 현탁제로서 경구 투여용으로 제조된다.
- [0152] 정제, 로젠지, 수성 또는 오일성 현탁제, 분산성 분제 또는 과립제, 에멀전, 경질 또는 연질 캡슐제, 또는 시럽제 또는 엘릭시르 형태의, 경구 투여용으로 적합한 조성물은 유효량의 본 발명의 화합물을 포함한다. 경구용 조성물은 제약 조성물 제조에 대하여 당업계에 공지되어 있는 임의의 방법에 따라 제조되고, 상기 조성물은 제약상 우수하고, 맛좋은 제제를 제공하기 위해 감미제, 향미제, 착색제, 및 보존제로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 작용제를 함유할 수 있다. 정제는 정제 제조에 적합한 비독성의 제약상 허용되는 부형제와 함께 활성 성분을 함유할 수 있다. 상기 부형제로는 예를 들어, 불활성 희석제, 예컨대 탄산칼슘, 탄산나트륨, 락토스, 인산칼슘, 또는 인산나트륨; 과립화제 및 붕해제, 예를 들어, 옥수수 전분, 또는 알긴산; 결합제, 예를 들어, 전분, 젤라틴 또는 아카시아; 및 윤활제, 예를 들어, 스테아린산 마그네슘, 스테아린산 또는 탈크가 있다. 정제는 코팅되지 않은 것이거나, 또는 위장관에서의 붕해 및 흡수를 지연시켜 장기간 동안 작용이 지속될 수 있도록 하기 위해 공지 기법에 의해 코팅한다. 예를 들어, 시간 지연 물질, 예컨대 글리세릴 모노스테아

레이트 또는 글리세릴 디스테아레이트가 사용될 수 있다. 경구용 제제는 활성 성분이 불활성 고체 희석제, 예를 들어, 탄산칼슘, 인산칼슘, 또는 카올린과 혼합되어 있는 경질 젤라틴 캡슐제로서, 또는 활성 성분이 물 또는 오일 매질, 예를 들어, 땅콩유, 액체 파라핀 또는 올리브유와 함께 혼합되어 있는 연질 젤라틴 캡슐제로서 제공될 수 있다.

- [0153] 일부 실시양태에서, 화합물 또는 조성물은 주사에 의해 투여되는 것으로 제조된다. 특정의 주사용 조성물은 수성 등장성 액제 또는 현탁제이고, 좌제는 유리하게는 지방 에멀전 또는 현탁제로부터 제조된다. 상기 조성물은 멸균될 수 있고/거나, 아주반트, 보존제, 안정화제, 습윤제, 또는 유화제, 용해 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염, 및/또는 완충제를 함유할 수 있다. 추가로, 이는 또한 치료학상 가치있는 다른 물질을 함유할 수 있다. 상기 조성물은 각각 종래의 혼합, 과립화, 또는 코팅 방법에 따라 제조되고, 활성 성분을 약 0.1-75%로, 또는 약 1-50%로 함유한다.
- [0154] 일부 실시양태에서, 화합물 또는 조성물은 국소 투여용으로 제조된다. 경피적으로 적용하기에 적합한 조성물은 적합한 담체와 함께 유효량의 본 발명의 화합물을 포함한다. 경피 전달에 적합한 담체로는 호스트의 피부를 통과하는 것을 지원하는 약리학상 허용되는 흡수성 용매를 포함한다. 예를 들어, 경피용 장치는 배킹 부재, 임의로 담체와 함께 화합물을 함유하는 저장소, 임의로, 장기간에 걸쳐 조절형의 사전결정된 속도로 호스트의 피부로 화합물을 전달하기 위한 속도 조절 막, 및 본 장치를 피부에 고정시키기 위한 수단을 포함하는 밴드 형태이다.
- [0155] 예컨대 피부 및 눈에 국소적으로 적용하기에 적합한 조성물로는 수성 액제, 현탁제, 연고제, 크림제, 젤제 또는 예컨대 에어로졸에 의해 전달하기 위한 분무가능한 제제 등을 포함한다. 상기와 같은 국소 전달용 시스템은 특히 진피 적용용으로, 예컨대 피부암 치료용으로, 예컨대 선크림, 로션, 스프레이 등에서의 예방적 용도에 적절할 것이다. 따라서, 이는 특히 당업계에서 주지되어 있는 국소용 제제 (화장품 포함)에 사용하기 위한 것으로 적합화된다. 이는 가용화제, 안정제, 장성 증진제, 완충제 및 보존제를 함유할 수 있다.
- [0156] 본원에서 사용되는 바, 국소 적용은 또한 흡입 또는 비내 적용과 관련될 수 있다. 이는 편의상 건식 분말 흡입기로부터의 건식 분체 형태로 (단독으로, 혼합물로서, 예를 들어, 락토스와의 건식 블렌드로서, 또는 예를 들어, 인지질과의 혼합 성분 입자로서), 또는 적합한 추진제를 사용하거나, 사용하지 않고, 가압형 용기, 펌프, 스프레이, 분무기 또는 네블라이저로부터의 에어로졸 스프레이 제공 형태로 전달될 수 있다.
- [0157] 일부 실시양태에서, 화학식 I의 화합물의 유효량은 약 10 mg/kg/일, 내지 약 500 mg/kg/일이다. 특정 실시양태에서, 유효량은 약 25 mg/kg/일 내지 약 300 mg/kg/일, 예컨대 약 100 내지 약 250 mg/kg/일이다. 투여량은 1 일당 1-4회 용량으로 투여될 수 있거나, 격일로 투여될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 투여량은 약 200 mg/kg/일이고, 1일당 1 또는 2회 경구 용량으로 투여된다.
- [0158] 본 발명은 추가로 물이 특정 화합물의 분해를 촉진시킬 수 있는 바, 활성 성분으로부터 본 발명의 화합물을 포함하는 무수 제약 조성물 및 투여 형태를 제공한다.
- [0159] 본 발명의 무수 제약 조성물 및 투여 형태는 무수 또는 저수분 함유 성분 및 저수분 또는 저습도 조건을 이용하여 제조될 수 있다. 무수 제약 조성물은 그의 무수 성질이 유지될 수 있도록 제조 및 보관될 수 있다. 따라서, 무수 조성물은 적합한 제제화용 키트에 포함시킬 수 있도록, 물에 노출되는 것을 막아주는 것으로 알려져 있는 물질을 사용하여 패키징된다. 적합한 패키징의 예로는 밀폐 밀봉형 호일, 플라스틱, 단위 용량 용기 (예컨대 바이알), 블리스터 팩 및 스트립 팩을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0160] 본 발명은 추가로 활성 성분으로서의 본 발명의 화합물이 분해되는 속도를 감소시키는 하나 이상의 작용제를 포함하는 제약 조성물 및 투여 형태를 제공한다. 본원에서는 "안정제"로 지칭되는 상기와 같은 작용제로는 항산화제, 예컨대 아스코르브산, pH 완충제, 또는 염 완충제 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0161] 본원에 기술된 화합물 및 방법은 혈액-뇌 장벽을 투과할 수 있고, 뇌의 종양에 및/또는 그 주변에 TAM이 축적되는 것을 억제시킬 수 있는, 그의 입증된 능력에 기초하여, 다양한 뇌 종양을 치료하는 데 유용하다. 일부 실시양태에서, 뇌 종양은 신체 다른 부위에서 기원한 암의 전이이다. 다른 실시양태에서, 뇌 종양은 신경교종, 예컨대 다형성 교모세포종이다.
- [0162] 유리 형태, 또는 염 형태의 화학식 I의 화합물은 예컨대 다음 섹션에서 제공되는 바와 같은 시험관내 및 생체내 시험에서 제시된 바와 같이, 약리학상 가치있는 특성, 예컨대 CSF-1R 및 임의로 PDGFR 조절 특성을 보이는 바, 이에 요법을 위한 것으로 권고된다.

- [0163] 따라서, 추가의 실시양태로서, 본 발명은 화학식 I의 화합물의 용도, 또는 요법에서의 용도를 제공한다. 추가의 실시양태에서, 요법은 CSF-1R을 억제시킴으로써 치료될 수 있는 질환으로부터 선택된다. 또 다른 실시양태에서, 질환은 상기 언급된 목록으로부터 선택되고, 적합하게는 임의의 뇌 종양, 더욱 적합하게는, 교모세포종 예컨대 다형성 교모세포종이다.
- [0164] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 치료 유효량의, 화학식 I의 화합물, 또는 본원에 개시된 상기 화합물의 실시양태들 중 임의의 것을 투여하는 단계를 포함하는, CSF-1R을 억제시킴으로써 치료되는 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 추가의 실시양태에서, 질환은 상기 언급된 목록으로부터 선택되고, 적합하게는 임의의 뇌 종양, 예컨대 구체적으로는 다형성 교모세포종을 비롯한, 신경교종 중 하나이다.
- [0165] 본 발명의 제약 조성물 또는 조합물의 단위 투여량은 약 50-70 kg인 대상체인 경우, 활성 성분(들) 약 1-1,000 mg, 또는 활성 성분(들) 약 1-500 mg, 또는 약 1-250 mg, 또는 약 1-150 mg, 또는 약 0.5-100 mg, 또는 약 1-50 mg일 수 있다. 화합물, 제약 조성물, 또는 그의 조합물의 치료학상 유효 투여량은 대상체 종, 체중, 연령 및 개인별 상태, 치료되는 장애 또는 질환, 또는 그의 중증도에 따라 달라진다. 당업계의 숙련된 의사, 임상사, 또는 수의사는 본 개시내용에 기초하여 장애 또는 질환을 치료하거나, 그의 진행을 억제시키는 데 필요한 각 활성 성분들의 유효량을 쉽게 결정할 수 있다.
- [0166] 상기 언급된 투여 특성은 유리하게는 포유동물, 예컨대 마우스, 래트, 개, 원숭이, 또는 그의 단리된 기관, 조직 및 표본을 사용하여 시험관내 및 생체내에서 입증가능하다. 본 발명의 화합물은 시험관내에서, 액제 형태로, 예컨대 수성 액제 형태로, 및 생체내에서는 장으로, 비경구적으로, 유리하게는 정맥내로, 예컨대 현탁제로서 또는 수성 액제로 적용될 수 있다. 시험관내에서 투여량 범위는 약 10^{-3} 몰 내지 10^{-9} 몰 농도일 수 있다. 생체내 치료 유효량 범위는 투여 경로에 따라 약 0.1-500 mg/kg, 전형적으로, 10-400 mg/kg, 또는 약 100-300 mg/kg, 또는 1-100 mg/kg일 수 있다. 일부 실시양태에서, 약 200 mg/kg의 용량이 교모세포종 치료에 적합하고, 이는 경구 투여될 수 있다.
- [0167] 본 발명에 따른 화합물의 활성은 시험관내 & 생체내 방법에 따라 평가될 수 있다.
- [0168] US20080045528에 기술된 시험 검정 방법을 사용하는 경우, 본 발명의 화합물은 CSF-1R을 억제시키는 것으로 나타날 수 있다. 본원에 기술된 바와 같이, 상기 화합물은 혈액-뇌 장벽을 쉽게 횡단하고, 이는 또한 뇌에서 종양 성장을 억제시키거나, 역전시킨다. 바람직하게, 종양은 공지된 방법에 의해 검출될 수 있고, 치료 진행 상태는 공지된 방법에 의해 모니터링될 수 있다. 일부 실시양태에서, 치료 진행 상태는 종양 크기 및 임의의 전이를 측정하는 MRI (자기 공명 영상화)를 사용함으로써 모니터링된다.
- [0169] 본 발명의 화합물은 하나 이상의 다른 치료제, 예컨대 본원에 기술된 공동치료제와 함께 동시에, 또는 그 이전, 또는 그 이후에 투여될 수 있다. 본 발명의 화합물은 동일한 또는 상이한 투여 경로에 의해 별개로, 또는 다른 작용제와 동일한 제약 조성물로 함께 투여될 수 있다.
- [0170] 한 실시양태에서, 본 발명은 요법에서 동시에, 별개로, 또는 순차적으로 사용하기 위한 조합된 제제로서 화학식 I의 화합물 및 하나 이상의 다른 치료제를 포함하는 제품을 제공한다. 한 실시양태에서, 요법은 CSF-1R의 억제에 의해 매개되는 질환 또는 병증의 치료이다. 조합된 제제로서 제공되는 제품은 동일한 제약 조성물로 화학식 I의 화합물 및 다른 치료제(들)를 함께 포함하거나, 또는 개별 형태로, 예컨대 키트 형태로 화학식 I의 화합물 및 다른 치료제(들)를 포함하는 조성물을 포함한다.
- [0171] 한 실시양태에서, 본 발명은 화학식 I의 화합물 및 또 다른 치료제(들)를 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 임의로, 제약 조성물은 상기 기술된 바와 같은 제약상 허용되는 부형제, 또는 하나 초과 상기 공동치료제를 포함할 수 있다.
- [0172] 한 실시양태에서, 본 발명은, 하나 이상이 화학식 I의 화합물을 함유하는 것인, 2개 이상의 개별 제약 조성물을 포함하는 키트를 제공한다. 한 실시양태에서, 키트는 상기 조성물을 개별적으로 보유하기 위한 수단, 예컨대 용기, 분할된 병, 또는 분할된 호일 팩을 포함한다. 상기 키트의 일례로는 전형적으로 정제, 캡슐제 등을 패키징하는 데 사용되는 것과 같은 블리스터 팩이 있다.
- [0173] 본 발명의 키트는 예를 들어, 경구용 및 비경구용인 것과 같이, 상이한 투여 형태를 투여하는 데, 상이한 투여 간격으로 개별 조성물을 투여하는 데, 또는 개별 조성물을 서로에 대하여 적정하는 데 사용될 수 있다. 용법을 준수하는 데 도움을 주기 위해, 본 발명의 키트는 전형적으로 투여 설명서를 포함한다.
- [0174] 본 발명의 조합 요법에서, 본 발명의 화합물 및 다른 치료제는 동일한 또는 상이한 제조업체에 의해 제조 및/또

는 제제화될 수 있다. 또한, 본 발명의 화합물 및 다른 치료제는 (i) (예컨대 본 발명의 화합물 및 다른 치료제를 포함하는 키트인 경우) 조합 제품이 의사에게 공개되기 이전에; (ii) 투여 직전에 의사 스스로 (또는 의사의 가이드스 하에); (iii) 예컨대 본 발명의 화합물 및 다른 치료제를 순차적으로 투여하는 동안 환자에서 원래대로 조합 요법으로 합쳐질 수 있다.

[0175] 따라서, 본 발명은 약제가 화학식 I의 화합물과 함께 사용하기에 적합한 것으로 본원에 개시된 추가의 화학요법제들 중 하나를 비롯한, 또 다른 치료제와 함께 투여하기 위한 것으로 제조되는 것인, CSF-1R에 의해 매개되는 질환 또는 병증을 치료하기 위한 화학식 I의 화합물의 용도를 제공한다. 본 발명은 또한 약제가 화학식 I의 화합물과 함께 투여되는 것인, CSF-1R에 의해 매개되는 질환 또는 병증을 치료하기 위한 또 다른 치료제의 용도를 제공한다.

[0176] 본 발명은 또한 화학식 I의 화합물이 또 다른 치료제와 함께 투여하기 위한 것으로 제조되는 것인, CSF-1R에 의해 매개되는 질환 또는 병증을 치료하는 방법에서 사용하기 위한 화학식 I의 화합물을 제공한다. 본 발명은 또한 또 다른 치료제가 화학식 I의 화합물과 함께 투여하기 위한 것으로 제조되는 것인, CSF-1R에 의해 매개되는 질환 또는 병증을 치료하는 방법에서 사용하기 위한 또 다른 치료제를 제공한다. 본 발명은 또한 화학식 I의 화합물이 또 다른 치료제와 함께 투여하기 위한 것으로 제조되는 것인, CSF-1R에 의해 매개되는 질환 또는 병증을 치료하는 방법에서 사용하기 위한 화학식 I의 화합물을 제공한다. 본 발명은 또한 또 다른 치료제가 화학식 I의 화합물과 함께 투여하기 위한 것으로 제조되는 것인, CSF-1R에 의해 매개되는 질환 또는 병증을 치료하는 방법에서 사용하기 위한 또 다른 치료제를 제공한다.

[0177] 본 발명은 또한 환자가 앞서 (예컨대 24시간 이내에) 또 다른 치료제로 치료받은 경험이 있는 것인, CSF-1R에 의해 매개되는 질환 또는 병증을 치료하기 위한 화학식 I의 화합물의 용도를 제공한다. 본 발명은 또한 환자가 앞서 (예컨대 24시간 이내에) 화학식 I의 화합물로 치료받은 경험이 있는 것인, CSF-1R에 의해 매개되는 질환 또는 병증을 치료하기 위한 또 다른 치료제의 용도를 제공한다.

[0178] 한 실시양태에서, 다른 치료제는 항혈관신생제, 이리노테칸과 병용되거나 병용되지 않는 베바시주맙, 니트로소우레아, 예컨대 카르무스틴 (BCNU), 플라틴, 예컨대 시스-플라티늄 (시스플라틴), 알킬화제, 예컨대 테모졸로미드, 티로신 키나제 억제제 (게피티닙 또는 에를로티닙), 우크라인, 및 칸나비노이드로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 다른 작용제는 항혈관신생 화합물, 칸나비노이드, 및 테모졸로미드로부터 선택되는 공동치료제이다.

[0179] 특정의 치료학상의 이익을 제공할 수 있는 구체적인 개별 조합물은 테모졸로미드와의 조합으로 화합물 Ia, Ib, Ic, Id, Ie, If, Ig, 또는 Ih를 포함한다. 이러한 조성물은 각종 뇌 종양, 예컨대 다형성 교모세포종 치료를 위해 본원에 기술된 바와 같이 경구 투여될 수 있다.

[0180] 치료 방법, 화합물, 및 제약 조성물 이외에도, GBM 치료를 위해 CSF-1R 화합물의 효능과 관련된 특정의 유전자 서명 변화 또한 확인할 수 있다. 하기 실시예는 이러한 변화에 대한 정보를 제공하고, 본원에 개시된 치료 방법과 함께 사용될 수 있는 유전자 서명 또는 바이오마커를 확인한다. 당업계의 독자에게 자명한 바와 같이, 본원에서 제공되는 라쏘 서명 및 SVM 서명 데이터는, 환자로부터 샘플을 수득하고, 샘플에 대한 유전자 발현 데이터를 본원에 개시된 유전자 발현 변화 및 서명에 대해 비교하여 양성 예후 및/또는 연장된 생존 기간과 상호 연관시킴으로써 상기 방법으로 치료받는 환자에 대한 예후를 측정하는 데 사용될 수 있다.

[0181] 실시예

[0182] 당업계에 공지되어 있는 방법, 특히, WO2007/121484에 기술되어 있는 방법에 따라 본 발명의 화합물을 제조하였다.

[0183] 2695 세퍼레이션 모듈(2695 Separation Module)이 장착된 워터스 밀레니엄(Waters Millenium) 크로마토그래피 시스템 (미국 매사추세츠 밀포드)을 이용하여 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC)에 의해 화합물 및/또는 중간체의 특징을 규명하였다. 분석용 칼럼은 올테크(Alltech: 미국 일리노이주 디어필드)로부터 입수한 역상 페노메넥스 루나(Phenomenex Luna) C18-5, 4.6 x 50 mm였다. 전형적으로 5% 아세토니트릴/95% 물로 출발하여, 10분 동안에 걸쳐 100% 아세토니트릴로 진행되는 구배 용리를 사용하였다 (유량 2.5 mL/min). 모든 용매는 0.1% 트리플루오로아세트산 (TFA)을 함유하였다. 화합물은 220 또는 254 nm에서의 자외선 (UV) 흡수에 의해 검출하였다. HPLC 용매는 버딕 앤 잭슨(Burdick and Jackson: 미국 미시간주 무스케간), 또는 피셔 사이언티픽 (Fisher Scientific: 미국 펜실베이니아주 피츠버그)으로부터 입수하였다.

[0184] 질량 분석법 분석은 두 LCMS 기기: 워터스 시스템(Waters System) (얼라이언스(Alliance) HT HPLC 및 마이크로

매스(Micromass) ZQ 질량 분석기; 칼럼: 이클립스 XDB-C18, 2.1 x 50 mm; 구배: 4 min 동안에 걸쳐 0.05% TFA를 포함하는 물 중 5-95% (또는 35-95%, 또는 65-95% 또는 95-95%) 아세토니트릴; 유량 0.8 mL/min; 분자량 범위 200-1,500; 콘 전압 20 V; 칼럼 온도 40°C), 또는 휴렛 팩커드 시스템(Hewlett Packard System) (시리즈 1100 HPLC; 칼럼: 이클립스 XDB-C18, 2.1 x 50 mm; 구배: 4 min 동안에 걸쳐 0.05% TFA를 포함하는 물 중 5-95%; 유량 0.8 mL/min; 분자량 범위 150-850; 콘 전압 50 V; 칼럼 온도 30°C) 중 하나에서 수행하였다. 모든 질량은 양성자화된 모체 이온의 것으로 기록하였다.

[0185] 화합물 If에 대한 분석 데이터: HPLC 체류 시간 1.93 min. 분자 이온 (MH⁺): m/z = 422.1 (LC/MS RT = 0.50 min).

[0186] 실시예 1: 대식세포의 개수는 정상적인 뇌와 비교하여 신경교종발생의 마우스 모델에서 증가되어 있다.

[0187] 본 실시예에서는 종양 관련 대식세포 (TAM)가 RCAS-PDGF-B-HA/네스틴-Tv-a;Ink4a/Arf^{-/-} 마우스 모델에서 신경교종발생에 기여한다는 것을 입증하였다. 상기 마우스에서, 종양 발생을 성체에서 유도하였을 때, 발생한 대다수의 병변은 고등급 다형성 교모세포종 (GBM)이었고, 이는 조직학상 인간 GBM을 모델로 하였다. 도 1. (a) 주사 맞지 않은 네스틴-Tv-a;Ink4a/Arf^{-/-} 마우스로부터의 대뇌/전뇌 (정상적인 뇌), 또는 증상을 보이는 RCAS-PDGF-B-HA/네스틴-Tv-a;Ink4a/Arf^{-/-} (PDG) 마우스로부터의 IV 등급 종양 (GBM)을 유세포 측정법을 위해 파파인 처리하여 단일 세포 현탁액으로 만들었다 (각각 n=5). CD45⁺ 백혈구는 3.6 ± 0.6%에서 13.1 ± 2.0%로 유의적으로 증가하였다. CD11b⁺ 골수성 세포/대식세포는 백혈구 중 압도적인 다수를 차지하였으며 (CD45⁺ 백혈구 중 89.9-98.5%), 정상적인 뇌 (3.3 ± 0.5%)와 비교하여 종양 중 CD45⁺CD11b⁺ 세포 (12.7 ± 2.0%)는 3.8배 증가되어 있었고, CD45⁺CD11b⁻ 세포 집단에서는 어떤 차이도 없었다. (b) 정상적인 뇌 또는 증상을 보이는 PDG 마우스로부터의 GBM 조직 절편을 CSF-1R, CD68 (대식세포), 및 DAPI에 대해 면역형광 방식으로 공동으로 염색시켰다. (c) 정상적인 뇌 및 GBM 종양 (각각 n=3)을 RNA 단리, cDNA 합성, 및 qPCR에 사용하였다. 검정은 3중으로 수행하였고, 각 샘플에 대한 발현은 유비퀴틴 C(Ubc)로 정규화시켰다. 발현을 정상적인 뇌에 대해 상대적인 값으로 표시하였다. (d) 정상적인 뇌 또는 증상을 보이는 PDG마우스로부터의 GBM 조직 절편을 CSF-1R에 대하여 대식세포 마커인 F4/80 및 CD11b와 함께 조합하여, 이 뿐만 아니라, Iba-1 (대식세포/소교세포)와 함께 F4/80, CD11b, 및 CD68과 조합하여 염색하였다. 핵 대비 염색을 위해 DAPI를 사용하였다. 스케일 바, 50 μm. 데이터는 평균 + SEM으로 제시하였다. 비대응 양측 스튜던츠 t-검정을 사용하여 P 값을 획득하였다; *P<0.05; **P<0.01.

[0188] 대식세포 특이 항체 CD68로 염색함으로써 나타난 바와 같이, 대식세포의 개수는 정상적인 뇌에 비하여 GBM 조직 중에서 상당히 더 높았다 (도 1b). 이는 유세포 측정법 분석에 의해 확인할 수 있었는데, 여기서, 종양 관련 백혈구 (CD45⁺)가 종양 매스의 13.1%를 구성하였고, 대다수가 대식세포(CD11b⁺)였다 (도 1a). GBM과 비교하여 정상적인 뇌에서의 발현을 분석한 결과, CSF-1 및 CSF-1R 뿐만 아니라, CD68의 mRNA 수준은 종양에서 증가되어 있는 것으로 밝혀졌다 (도 1c).

[0189] CSF-1 및 그의 수용체의 공급원을 측정하기 위해서 상이한 세포 유형-특이 집단 또한 GBM으로부터 얻었다. 오직 종양 세포 분획 중에서만 TVA 수용체 발현, 및 TAM에서만 단독으로 CD11b의 발현에 의해 상이한 집단의 순도를 확인하였다. CSF-1은 종양 세포 및 TAM 둘 모두에 의해 발현된 반면, CSF-1R은 오직 TAM에 의해서만 발현되었다 (도 1d). 도 1d에서 3개로 이루어진 각 군에서 첫번째 기둥 표시는 혼합형 세포이고, 두번째 것은 FACS-정제된 종양 세포이고, 세번째 것은 FACS-정제된 TAM이고; 데이터 정규화를 위해 혼합형 세포를 1로 설정하였다. 그래프 관찰 결과, 종양 세포에서는 어떤 CD11b 발현도 없었고, 종양 세포에서는 CSF-1R 발현도 없는 반면, TVA는 TAM이 아닌 오직 종양 세포만을 염색시켰고, CSF-1은 종양 및 TAM 세포 둘 모두에 대략적으로 동일한 양으로 존재하였다. 이러한 관찰 결과는 면역염색법에 의해 확인할 수 있었고, CSF-1R⁺ 세포 모두, 이 또한 CD68에 대하여 양성이었다 (나타내지 않음). 이를 통해 상기 모델에서 CSF-1R 억제 이후 종양 발생에 대하여 미치는 임의의 효과는 대식세포에 의존한다는 것이 입증되었다.

[0190] 실시예 2: CSF-1R 억제제 BLZ945 분석: 약동학적 성질 및 세포 기반 검정

[0191] BLZ945 (화합물 Ic)는 골에서 종양 유도된 골 용해성 병변을 억제시키기 위한 선택적 c-fms (CSF-1R) 키나제 억제제로서 개시된 바 있다. BLZ945는 생화학적 검정에서는 1 nM에서 CSF-1R을 억제시키고, 약 67 nM의 IC50으로 CSF 의존성 세포 증식을 억제시키는 ATP 경쟁적 억제제이다. 시험된 200가지 초과 다양한 키나제 대부분의 IC50 값은 >10 μM (10,000 nM)이고, cKIT 및 PDGFRβ에 대한 IC50 값은 각각 3.5 μM (3,500 nM) 및 5.9 μM (5,900 nM)이었다. 앰비트(Ambit)® 키나제 검정에서 수백 가지의 키나제에 대하여 스크리닝되었을 때, 화합물

은 오직 CSF-1R, PDGFR α 및 PDGFR β 에 대해서만 대조군의 50%보다 더 낮은 활성을 보였고, 직접적인 억제 검정에서 두 PDGFR에 대한 활성은 CSF-1R에 대한 그의 활성보다 훨씬 더 낮았다. 본원에서 논의되는 바와 같이, BLZ945와 유사하나, (S,S) 입체화학을 가지는 화합물은 CSF-1R에 대한 그의 고수준의 활성과 유사한 수준으로 PDGFR β 에 대해서도 활성을 보였다.

[0192] 오직 뇌의 우측 절반부에서만 검출가능한 GBM을 가지는 마우스를 BLZ945로 처리한 후, 다양한 시점 (15 mins, 2 hr, 8 hr, 24 hr)에 혈장, 뇌의 우측 및 좌측 절반부 중의 화합물의 농도를 측정하였다. 도 2에 제시된 바와 같이, 혈장 농도는 100 μ M보다 좀 더 큰 값까지 신속하게 상승하였고, 8 hr째에는 계속해서 50 μ M 초과인 값으로 유지된 후, 24 hr째까지 저수준으로 하락하였다. 뇌 조직 중의 농도는 유사한 패턴으로 전개되었다: 이는 계속해서 혈장 수준보다는 약간 더 낮은 상태로 유지되었지만, 15 min 및 2 hr 시점에 50 μ M 초과인 값으로 잘 상승하였다. 이는 BLZ945가 혈액-뇌 장벽 (BBB)을 통과하고, 대식세포 성장 및/또는 생존을 억제시키는 데 충분한 농도가 뇌에서 달성될 수 있다는 것을 나타낸다. 또한, 이는 화합물이 종양을 함유하는 뇌의 절반부 및 종양이 없는 뇌의 절반부를 유사한 수준으로 투과한다는 것을 나타내며, 이는 투과가 종양의 존재에 의해 유발되는, BBB 중의 병변에 따라 달라지지 않는다는 것을 제안한다. 배양물 중 대식세포를 효과적으로 억제시키는 데 필요한 수준을 훨씬 넘는, 치료학상 유효한 약물 수준을 뇌에 제공하는 데 충분한 속도로 신속하게 혈액-뇌 장벽을 투과한다는 것이 입증되었다.

[0193] 실시예 3: 시험관내에서 상이한 세포 유형에 대한 BLZ945의 억제 활성

[0194] 골수 유래 대식세포 (BMDM)를 앞서 문헌에 기술되어 있는 바와 같이, 단리시키고, 구별지은 후, 67 nM BLZ945로 처리하였다. BLZ945는 각 시점 (1.5 min, 3 min, 5 min)에 CSF-1 자극 이후의 CSF-1R 인산화를 뚜렷이 억제시켰다 (도 3a).

[0195] BLZ945가 대식세포에 대하여 미치는 효과 또한 조사하였다: 67 nM 내지 6,700 nM의 용량 범위가 대식세포 생존을 극적으로 감소시켰는데, 이는 CSF-1 금단의 효과와 유사하였다 (도 3b).

[0196] (GBM 모델의 유전적 배경이 되는) Ink4a/Arf 널 마우스로부터의 BMDM 또한 BLZ945의 존재 여부에 대하여 시험하였다. 도 3c에는 야생형 마우스로부터 유래된 것과 같은, 상기 BMDM은 농도가 67 nM 이상인 BLZ945에 의해 상당히 억제되었다는 것이 제시되어 있다 (도 3d). 따라서, BLZ945는 대식세포 생존능을 완전하게 차단하는, CSF-1R 신호전달의 효과적인 억제제이다. Ink4a/Arf^{-/-} 마우스로부터의 BMDM 세포의 증식은 BLZ945 농도가 67 nM 이상일 때, CRL-2467 세포 (정상적인 마우스의 뇌)와 같이 강력하게 억제된 반면, 4마리의 마우스 및 1명의 인간 교모세포종 세포 배양물의 증식에 대해서는 심지어는 6,700 nM에서도조차 거의 영향을 미치지 않거나, 또는 어떤 영향도 미치지 않는다는 것이 도 3c-3e를 통해 입증되었다.

[0197] BLZ945가 종양 세포에 대해 미치는 직접적인 효과는 없다는 것을 측정하기 위해, 대식세포 성장에 대하여 효과가 있는 것으로 밝혀진 농도와 유사한 농도의 BLZ945로 인간 신경교종 세포주 및 일련의 원발성 종양 세포 및 신경구를 처리하였다. 배양물 및 생체내에서 PDGFR 신호전달에 의존하는 것으로 밝혀진, 인간 GBM으로부터 유래된 U87-MG 세포는 상기와 동일한 용량에서는 BLZ945 처리에 의해 어떤 영향도 받지 못했다 (도 3e). 유사하게, (마우스 RCAS-PDGFB-HA/네스틴-Tv-a; Ink4a/Arf^{-/-} GBM으로부터 유래된) 1차 신경구로부터 2차 신경구 형성은 BLZ945 처리에 의해 변경되지 않았다 (도 3f). BLZ945 처리가 신경구의 개수, 및 크기 어느 것에도 유의적인 영향을 미치지 못했다. 최종적으로, 2차 마우스 GBM 신경구로부터 확립된 다발성 종양 세포주에 대해 BLZ945가 미치는 효과를 조사하였고, 이 역시 어떤 차이도 없었다 (도 3f). 종합해 보면, BLZ945에 의한 CSF-1R 억제 효과는 대식세포에 특이적인 것이며, 종양 세포에 대해서는 인식가능한 정도의 직접적인 결과는 없다는 것이 본 실험을 통해 입증되었다.

[0198] 실시예 4: CSF-1R 억제제 BLZ945 처리가 신경교종 진행을 차단시킨다.

[0199] 대식세포 기반 검정에서 BLZ945의 강력한 억제 효과, 및 혈액-뇌 장벽을 통과할 수 있는 그의 입증된 능력을 고려해 볼 때, 상기 억제제를 RCAS-PDGFB-HA/네스틴-Tv-a; Ink4a/Arf^{-/-} 모델에서의 임상전 시험에서 시험하는 것이 바람직할 것으로 보였다. 문헌 [Hamardzumyan, et al., *Transl. Oncol.*, vol. 2, 89-95 (2009)]에 기술되어 있는 바와 같이, 5-6주령된 상기의 유전자 조작된 마우스에 RCAS-PDGFB-HA 바이러스 감염된 DF-1 세포를 주사하여 신경교종 형성을 개시시켰다. 종양 개시 후 2.5주째, 마우스 코호트에 20% 캡티솔 중 200 mg/kg BLZ945, 또는 대조군으로서 비히클 (20% 캡티솔)을 매일 경구 위관 영양법을 통해 투여하였다. 이어서, 무증상 생존 기간에 대하여 마우스를 평가하였다. 비히클 처리된 코호트에서 생존 기간 중간값은 5.71주 (40일)였고, 반면, BLZ945 처리된 코호트 중 64.4%는 주사 후 26주째 (31-32주령)인 시험 종료점까지 여전히 생존해 있었다

(도 4a, P<0.0001). *Ink4a/Arf*^{-/-} 배경의 마우스에서는 약 30주령제에 자발성 종양, 대개는 림프종 및 육종이 발생하기 시작하였으며, 이로 인해 보다 장기간의 연구에서는 신경교종 표현형의 해석이 복잡해질 수 있는 바, 상기와 같은 종료점을 선택하였다. 도 4a의 데이터에서는 바이러스 주사 후 8주째까지 무증상을 보이는 대조군 마우스 (오직 비히클만)는 없었지만, 처리된 마우스 중 절반 이상은 26주의 종료점제에도 무증상인 것으로 나타났다. 처리된 마우스 4마리는 조직학적 연구를 위해 12주째에 희생시켰다는 것으로 주의한다. 이중 3마리는 종양이 없었고, 1마리는 II 등급의 신경교종을 포함하였다.

[0200] 두 마우스 코호트 모두의 마우스에 대하여 종양 등급을 측정하였다 (도 4b 참조). 종료 단계에서 비히클로 처리된 마우스는 모두 고등급 종양을 가졌으며, 14마리의 마우스 중 13마리는 IV 등급의 GBM 병변을 가졌다. 대조적으로, BLZ945 처리된 동물은 유의적으로 악성이 더 작은 종양을 가졌고; 80%는 II 등급이거나, 또는 종양을 가지지 않았고; 남은 20%는 III 등급의 종양을 가졌다. 26주인 시험 종료점에 살아있는 마우스 중 56%에서는 어떤 검출가능한 병변도 없었다 (도 4b). 시험 동안 BLZ945 처리된 마우스 중 5마리는 증상을 보이는 것으로서 희생시켰고 (n=5), 시험 종료시에 희생시켰을 때에도 여전히 어떤 증상도 보이지 않는 군 (n=9)과 비교하였다. 상기 두 군 모두에서, 비히클로 처리된 동물과 비교하였을 때, 종양 등급은 유의적으로 감소하였다. 이는 BLZ945 치료법을 이용한 상기와 같은 장기간의 시험에서 생존 기간은 극적으로 증가하였고, 종양 악성은 감소하였다는 것을 보여주는 것이다.

[0201] 실시예 5: BLZ945가 종양 성장에 미치는 효과를 모니터링하기 위한 MRI 영상화

[0202] 종양 유도된 마우스에서 BLZ945에 대한 7일 동안의 단기간 시험을 표준 MRI 스캔에 의해 모니터링함으로써 종양 성장이 보통 빠르게 일어나는 때인 짧은 처리 기간 동안 종양 크기 변화를 측정하였다. MRI에 의해 RCAS-PDGF-B-HA/네스틴-Tv-a;*Ink4a/Arf*^{-/-} 마우스에서의 종양 부피를 측정하고, 종양 부피가 적어도 4.5 mm³ 이상이 되었을 때, 상기 시험에 포함시켰다. 상기 기술된 바와 같이, 마우스를 7일 동안 BLZ945, 또는 비히클 대조군으로 처리하였다. 처리 개시 전날, 처리 기간 중 중간 시점에, 및 시험 기간 종료 전날에 MRI 스캔을 수행하였다. 도 5a에 제시되어 있는 바와 같이, 비히클로 처리된 마우스에서는 상기와 같은 짧은 시험 동안에 걸쳐 종양 부피가 점진적으로 극적으로 증가하였으며, 종양 부피는 평균적으로 약 5배 증가하였다. MRI에 의해 측정된 바, BLZ945 처리는 종양 진행을 차단시켰고 (도 5a), 동일한 짧은 기간 동안에 걸쳐 종양 크기는 증가하지 않았다. 처리된 대상체 (하위 선)에서는 종양 확장이 거의 없거나, 전혀 일어나지 않은 반면, 비히클로 처리된 대조군에서는 종양 부피가 급격하게 증가하였다. 도 5b는 BLZ945 투여를 개시한 후 처음 6일 동안의 개개의 대조군 마우스 (상단 그래프) 및 처리된 마우스 (하단 그래프)에 대한 종양 부피를 보여주는 것이다. BLZ945로 처리된 동물들 거의 모두에서 종양 크기는 거의 증가하지 않거나, 전혀 증가하지 않는 것으로 나타난 반면, 모든 대조군 동물에서는 종양 부피가 크게 증가한 것으로 나타났다.

[0203] 도 5b에 제시되어 있는 바와 같이, 상기 기간 동안 비처리 종양의 부피는 약 150-850%만큼 증가한 반면, 처리된 동물 11마리 중 7마리에서는 종양 크기가 축소되었고, 처리된 동물 중 단 2마리에서만 종양 부피가 50% 초과로 증가하였다. 도 5e 및 5f에는 11마리의 시험 동물 및 대조군 동물 모두에 대한 종양 부피 데이터가 제시되어 있고, 이를 통해 6일간의 처리 동안 처리가 대체로 종양 크기 증가를 중단시킨 반면, 비처리된 종양은 상당히 성장한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 CSF-1R 신호전달, 및 추정된 CSF-1R-의존성 대식세포의 기여가 상기 마우스 모델에서 신경교종 진행에 중요하며, 인간 교모세포종에 대해 고도로 관련된 포유동물 모델에서 BLZ945가 뇌 종양 성장을 막을 수 있다는 것을 시사한다.

[0204] 동일한 GBM 모델에서의 보다 큰 종양 ("거대 종양" 코호트)에 대한 2차 생체내 시험에서, 종양 부피가 48.7 내지 132 mm³인 마우스를 BLZ945로 처리하고, 6일간의 기간 동안 MRI에 의해 종양 부피 변화를 모니터링하였다. 거의 모든 시험 동물에서 종양 부피는 실제로 감소하였고, 처리된 마우스 18마리 중 6마리에서는 종양 크기가 30% 이상 축소되었다 (도 5d 및 5g). 대조군 동물은 종료점까지 생존할 것으로 기대되지 않은 바, 이에 대조군 동물은 본 시험에는 포함시키지 않았다.

[0205] 실시예 6: BLZ945 처리된 종양에서 암의 홀마크 능력 분석

[0206] 신경교종발생에 대하여 CSF-1R 억제제가 미치는 현저한 효과를 확인함에 따라, 본 발명자들은 상기 반응에 대한 기본 기전을 조사하게 되었고, BLZ945 처리가 어떻게 암의 홀마크 능력 중 여럿에 대해 영향을 미쳤는지에 대해 측정하게 되었다. 단기 시험 (실시예 5 참조)으로부터 얻은 조직에 대해 분석을 수행하고, 이로써 상이한 처리군으로부터 얻은 종양을 정의된 동일한 종료점에서 비교할 수 있었다. 앞서 신경교종 세포를 확인하는 데 사용되어 온 펩티고세포 마커인 Olig2를 사용하여 종양 세포 밀도를 조사하였다. Olig2는 비히클 대조군과 비교하

여 BLZ945 처리군에서 유의적으로 감소되었는데, 이는 BLZ945가 종양 세포의 개수를 유의적으로 감소시켰다는 것을 보여주는 것이다 (도 6a).

[0207] 브로모데옥시우리딘 (BrdU) 혼입에 의해 측정되는 바, 증식성인 Olig2+ 세포의 비율에 관한 분석을 통해 BLZ945 군에서 유의적인 감소가 나타났다 (도 6b). 또한, BLZ945는 종양 세포의 증식도 유의적으로 감소시켰다.

[0208] 상기 세포에서 아폽토시스의 수준 또한 평가하였다. 세포질 절단형 카스파제-3 (CC3)+ 염색 및 응축된 핵이 있는 것을 아폽토시스 세포인 것으로 하여 계수하였다. 도 6c에 제시되어 있는 바와 같이, 비록 7일째 거대 종양 코호트에서는 염색이 거의 관찰되기는 하였지만, CSF-1R 억제제 처리는 특히 초기 시점에 아폽토시스를 증가시켰다.

[0209] 하기 표는 실시예 5로부터 얻은 샘플에 대하여 실시된 조직학적 분석 결과를 요약한 것이다:

표 1

조직학적 분석 결과

파라미터	비히클	BLZ945, 3일째	BLZ945, 7일째	BLZ945 거대, 3일째	BLZ945 거대, 7일째
종양 부피 (-1일째 대 6일째)	+ 498%	--	+ 0.68%	--	- 24.3%
전체 DAPI+ 세포	--	- 72%	- 80%	- 40%	- 65%
종양 세포 (%Olig2*)	--	- 27%	- 77%	- 14%	- 73%
증식 (%BrdU*Olig2*)	--	- 91%	- 67%	- 98%	- 94%
아폽토시스 (%CC3*)	--	+ 17-fold	+ 6-fold	+ 9-fold	+ 2-fold
맥관구조 (CD31 MVD)	--	--	- 17%	--	- 67%
대식세포 (%CD68*)	--	+ 3-fold	+ 2-fold	+ 2-fold	+ 4-fold
포식 지수	--	+ 2.6-fold	+ 3.0-fold	+ 2.2-fold	+ 4.1-fold
포식 능력	--	+ 11.5-fold	+ 5.0-fold	+ 7.1-fold	+ 6.0-fold

[0210]

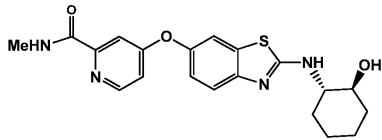
[0211] 종양 부피 변화는 1일째 부피에 대해 상대적인 종료점 (6일째)의 부피이며, 기록된 변화는 대조군 (비히클 군)에 대해 상대적인 값이다.

[0212] 종합해 보면, CSF-1R 신호전달을 억제시키는 것은 종양 세포 증식 감소 및 세포 사멸 증가에 대해 조합된 효과를 미침으로써 신경교종의 성장과 악성을 효과적으로 차단시킨다는 것이 상기 분석을 통해 입증되었다.

[0213] 요약하면, CSF-1R 억제제인 BLZ945가 매우 공격성인 신경교종 마우스 모델에서 종양 진행을 차단시키는 강력한 효능을 지닌 신규한 요법이라는 것이 상기 데이터를 통해 입증되었다. 화합물은 임상전 신경교종발생의 마우스 모델에서 생존을 극적으로 증진시켰고, 단기 및 장기의 시험 기간 동안에 걸쳐 종양 성장 속도는 급격히 감소시켰으며, 또한 종양 크기는 축소시켰다. 장기간 시험에서, BLZ945는 유의적인 마리수의 마우스에서 눈에 보이는 종양을 제거한 것으로 보였고, 처리된 마우스 대부분에서 종양 등급은 급격하게 감소시켰다.

[0214] 대식세포 침윤 증가가 인간 신경교종의 악성과 상관관계가 있는 것으로 나타난 바, 외관상, GBM을 앓는 대상체에서 TAM을 치료학적으로 표적화하는 것에 기인하여 상기 마우스 모델에서의 BLZ945의 효능은 인간을 비롯한 다른 포유동물에서의 교모세포종에 대해 미치는 효능으로 해석될 수 있을 것으로 기대된다. 대식세포를 비롯한 골수성 세포는 유방암 모델에서는 화학요법 반응을 둔화시키고, GBM 이식 모델에서는 방사선 조사 이후의 적응 반응을 증진시키는 것과 연루되어 있는 바, 상기 및 유사 CSF-1R 억제제는 신경교종에서 암 세포에 대해 지정된 요법과 조합될 경우, 효과적일 수 있고, 이러한 가능성은 추가 연구할만한 가치를 가지고 있다. 특히, 예컨대

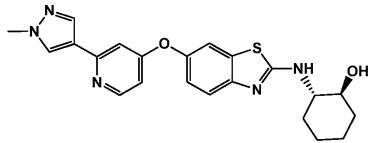
[0215] <화학식 Id>



[0216]

[0217] 및

[0218] <화학식 If>



[0219]

[0220] 와 같은 화합물은 유사 농도에서 CSF-1R 및 PDGFR을 표적화할 수 있는 능력을 제공하며, 따라서, 이는 BLZ945보다 훨씬 더 효과적일 수 있다. 실제로, 화합물 Id는 CSF-1R에 대한 그의 IC50보다 단지 약 4배 더 높은 IC50으로 PDGFR을 억제시켰다. 따라서, 치료학상 유효 농도의 상기 화합물들 중 어느 한 화합물이 두 표적 부위 모두에 영향을 미칠 수 있으며, 신경교종에서 상승작용 활성을 보일 것으로 기대된다.

[0221] 실시예 7

[0222] TAM의 명백한 고갈이나, 인간 GBM 세포에 대한 어떤 직접적인 항증식성 효과가 없음에도 불구하고, BLZ945 처리된 TAM이 생체내에서 상기와 같은 현저한 항증양 반응을 유도할 수 있게 하는 분자 기전을 조사하기 위해, 비히클 또는 BLZ945로 처리된 마우스로부터 CD11b⁺Gr-1⁻ TAM을 단리시키고, 마이크로어레이 발현 프로파일링을 수행하였다 (도 7 참조). 마이크로어레이 분석을 통해 상기 군들 사이에 유의적이게 차별적으로 발현되는 257개의 유전자를 확인할 수 있었으며: 52개의 유전자는 상향 조절되었고, 205개는 하향 조절되었다 (도 7b; 또한 8a 참조). 이들 중, 유전자 세트 농축 분석 (GSEA)을 통해 CSF-1R 신호전달 하류의 전사 인자인 Egr2의 표적은 BLZ945 처리된 TAM에서 하향 조절된 것으로 나타났다 (도 7c). 불균형적으로, M2 기와 관련된 유전자는 하향 조절되었다 (도 7d 및 7e).

[0223] 실시예 8: CFR-1R 억제제에 의해 유도된 유전자 발현 변화.

[0224] 라쏘 회귀 모델링을 사용하여 두 처리군을 최적으로 구별짓는 최소 개수의 유전자를 결정하였다. 이를 통해, 아드레노메둘린 (Adm), 아르기나제 1 (Arg1), 응고 인자 F13a1, 만노스 수용체 C 1형 (Mrc1/CD206), 및 프로테아제 억제제 세르핀B2로 구성된, BLZ945 처리에 대한 5개의 유전자 서명을 확인하였다 (도 8b). 흥미롭게도, 이들 유전자들은 각각 교대로 활성화되는/M2 대식세포 분극화와 관련이 있었으며, 5개의 유전자 중 4개는 BLZ945 처리 이후 하향 조절되었다. 5개의 유전자 서명 중 유일하게 상향 조절된 유전자인 세르핀B2 (이는 또한 PAI2로도 알려져 있다)는 일반적으로 생존 증가와, 특히 유방암 환자에서의 것과 양의 상관관계에 있었다.

[0225] 많은 조직과 관련하여, TAM의 M2 분극화는 더욱 큰 것으로 나타났는데, 이는 그의 면역억제성 및 발암전 작용과 연관이 있었다. 추가로, 보다 고등급의 종양과 관련이 있는 것인 스캐빈저 수용체 CD163 및 CD204 수준 증가에 의해 측정되는 바, 인간 신경교종에서의 대식세포는 M2 유사 표현형을 보였다. 제한된 5개의 서명에서 M2 유전자가 현저하게 증폭된 것을 고려하면, BLZ945 처리 후에 변경되는 추가의 M2 관련 마커가 존재하는지 여부를 측정하기 위해 257개의 유전자로 이루어진 목록에 관해 조사하였다. 이를 통해 10개의 추가 유전자[Alox15 (아라키도네이트 15-리폭시게나제); Cdh1 (카드헤린); Cd163 (CD163 항원); Fpr2 (포르밀 펩티드 수용체 2); Hmx1 (헴 옥시게나제 (테사이클링) 1); i11b (인터류킨 1 베타); 및 Stab1 (스타빌린 1)]가 밝혀졌는데, 이들 대다수는 하향 조절된 것이었다 (도 7d, 표 2). 고전적으로 활성화된/M1 분극화 유전자는 이에 상응하여 상향 조절되지 않았는데, 단, 인터류킨-1-베타 수용체만은 예외적이었다 (도 7e). 상기 데이터는, BLZ945에 의한 CSF-1R 억제에 대한 반응으로 TAM이 그의 M2 분극화를 상실하고, 항발암 작용을 획득할 수 있다는 것을 제안한다.

[0226] 이는 또한, 바이오마커로서 상기 유전자 발현 변화를 모니터링하는 것이 CSF-1R 억제제를 이용하여 신경교종 환자를 치료하는 것에 대해 가치있는 예후 정보를 제공할 수 있다는 것을 제안한다. 그의 유전자 발현 프로파일이 그의 관찰된 변화와 동일하거나 유사한 패턴으로 변화한 것인 치료받는 대상체는 CSF-1R 억제제를 이용한 치료에 대해 긍정적으로 반응할 것으로 예상할 수 있으며, 상기와 같은 유전자 발현 변화를 보이는 대상체는 CSF-

1R 억제제만의 부정적인 예후에 기인하여 대체 또는 추가의 치료를 받을 필요가 있을 수도 있다.

표 2

CSF-1R 억제제 처리 결과로서 나타난 차별적인 유전자 발현

기호	설명	변화 배수 BLZ945-비히클	명목 P 값
Akap12	A 키나제 (PRKA) 부속 단백질 (코라민) 12	-2.85	1.31E-04
Abhd15	압히드플라제 도메인 함유 15	-2.48	1.36E-05
Acp5	산성 포스파타제 5, 타르trate이트 저항성	-2.36	2.68E-03
Aoah	아실옥시아실 히드플라제	-2.43	3.83E-06
Ada	아데노신 데아미나제	-3.00	2.28E-07
Arxes1	지방세포 관련 X-염색체 발현 서열 1	-2.23	1.68E-03
Arxes2	지방세포 관련 X-염색체 발현 서열 2	-2.06	3.37E-04
Adm * #	아드레노메들린	-10.85	2.66E-09
Akht1a2	알테러드 테허드록제나제 패밀리 1, 서브패밀리 A2	-2.18	8.36E-04
Appb2	아밀로이드 베타 (A4) 전구체 단백질-결합, 패밀리 B, 구성원 2	2.27	2.97E-06
Ahn	아닐린, 액틴 결합 단백질	-2.99	1.38E-04
Asb10	양키린 반복부 및 SOCS 박스-함유 10	2.16	1.14E-03
Asb11	양키린 반복부 및 SOCS 박스-함유 11	2.19	3.00E-04
Mki67	모노클로날 항체 Ki67에 의해 확인된 항원	-7.18	2.78E-05
Apob	아포지방단백질 B	-2.92	3.42E-05
Apoc1	아포지방단백질 C-I	3.21	1.56E-06
Apoc4	아포지방단백질 C-IV	3.14	1.91E-04
Alox15 #	아라키도네이트 15-리폭시게나제	4.24	8.85E-03
Arg1 * #	아르기나제, 간	-8.48	5.07E-03
Aspm	asp(비정상적인 스피들)-유사, 대두종 관련 (초파리)	-2.22	1.02E-03
Aurka	오로라 키나제 A	-2.23	1.30E-03
Aurkb	오로라 키나제 B	-2.71	4.19E-06
Birc5	배클로바이러스 IAP 반복부-함유 5	-6.13	3.00E-06
Bambi	BMP 및 액티빈 막 결합 억제제, 상동체(제노푸스 라에비스(Xenopus laevis))	2.64	6.53E-05
Bub1	벤즈이미다졸에 의해 아무 제약을 받지 않는 버뮤 1 상동체 (S. 세레비시아에(S. cerevisiae))	-2.72	4.19E-06
Cdh1 #	카드헤린 1	-6.43	1.76E-04
Cdh2	카드헤린 2	-2.23	6.25E-04
Camkk1	칼슘/칼모듈린-의존성 단백질 키나제 키나제 1, 알파	-2.13	2.69E-06
Calml4	칼모듈린-유사 4	-2.06	2.12E-05
Chst2	카르보히드레이트 슬로트랜스퍼라제 2	2.44	5.14E-04
Cbr2	카르보닐 리덕타제 2	-4.15	2.93E-07
Cpa3	카르복시펩티다제 A3, 비만 세포	2.17	6.36E-04
Ctrnd2	카테닌 (카드헤린 관련 단백질), 베타 2	-2.94	8.46E-07
Ctsf	카텝신 F	2.16	1.53E-04
Cd163 #	CD163 항원	-2.65	3.87E-07
Cd22	CD22 항원	2.35	1.09E-05
Cd244	CD244 자연 킬러세포 수용체 2B4	-2.71	1.11E-07
Cd38	CD38 항원	-3.72	4.44E-05
Cd5	CD5 항원	3.62	2.96E-05
Cd83	CD83 항원	2.28	2.53E-05
Cd93	CD93 항원	-2.42	2.30E-07
Cks1b	CD28 단백질 키나제 1b	-2.54	1.71E-06

[0227]

Cdc20	세포 분열 주기 20 상동체(S. 세레비지아에)	-2.75	1.16E-04
Cdc45	세포 분열 주기 45 상동체(S. 세레비지아에)	-2.03	9.79E-08
Cdc6	세포 분열 주기 6 상동체(S. 세레비지아에)	-3.67	8.12E-08
Cdca5	세포 분열 주기 관련 5	-2.24	6.77E-06
Cenpe	동원체 단백질 E	-4.18	1.96E-05
Cenpk	동원체 단백질 K	-2.45	1.46E-05
Cep55	중심체 단백질 55	-2.40	6.23E-05
Cort	케모카인(C-C 모티프) 수용체 1	-4.56	6.86E-05
Cxcr7	케모카인(C-X-C 모티프) 수용체 7	-2.26	6.65E-03
Cspg5	콘드로이틴 술페이트 프로테오글리칸 5	-2.61	1.09E-05
Clu	클러스테린	-2.34	3.55E-04
F3	응고 인자 III	-2.11	4.58E-03
F9	응고 인자 IX	2.12	5.92E-04
F13a1 * #	응고 인자 XIII A1 서브유닛	-10.66	1.39E-09
Gol11a1	골라겐 XI형 알파 1	-3.49	3.09E-04
Col14a1	골라겐 XIV형 알파 1	-2.65	1.37E-06
Cfp	보체 인자 프로페린	-2.64	2.60E-04
Cntn1	콘택틴 1	-4.93	2.80E-08
Cpna2	코파인 II	-2.20	1.13E-05
Crybb1	결정질, 베타 B1	-2.83	2.44E-05
Clec4n	C형 렉틴 도메인 패밀러 4, 구성원 n	-6.53	4.34E-10
Ccna2	시클린 A2	-3.90	1.19E-05
Ccnb1	시클린 B1	-3.55	2.25E-05
Ccnb2	시클린 B2	-4.53	1.16E-05
Ccnd1	시클린 D1	-3.01	1.06E-08
Ccnd2	시클린 D2	-3.34	1.36E-05
Ccne2	시클린 E2	-5.28	3.67E-08
Ccnf	시클린 F	-2.36	1.49E-04
Cdk1	시클린-의존성 키나제 1	-2.18	2.75E-05
Cst7	시스테인 P(류코시스테인)	2.62	2.29E-07
Cyp4v3	시토크롬 P450, 패밀러 4, 서브패밀러 v, 폴리펩타이드 3	2.14	1.15E-05
Cpeb1	세포질 폴리아데닐화 요소 결합 단백질 1	2.86	1.97E-05
Ckap2	세포골격 관련 단백질 2	-2.17	1.80E-04
Dchd1	DDHD 도메인 함유 1	2.66	4.66E-03
Dner	델타/노치-유사 EGF 관련 수용체	-2.68	2.65E-04
Dck	데옥시시타딘 키나제	-2.07	2.50E-04
Depdc1a	DEP 도메인 함유 1a	-2.81	9.05E-05
Dhfr	디히드로플레이트 리미타제	-2.40	5.79E-06
Prm1	DNA 프리마제, p49 서브유닛	-2.76	2.87E-07
D17H6S56E-5	DNA 절편, Chr 17, 인간 D6S56E 5	-2.01	1.66E-03
Ddih4	DNA 손상 유도성 전사제 4	-2.43	5.07E-06
Dusp1	이중 특이성 포스파타제 1	2.33	3.55E-04
E2f6	E2F 전사 인자 8	-2.71	1.20E-05
Ect2	ect2 은코진	-3.19	1.65E-04
Emb	엠비진	-2.59	9.66E-05
Eepd1	엔도뉴클레아제/엑소뉴클레아제/포스파타제 패밀러 도메인 함유 1	2.70	1.62E-06
Ezh2	제스트 인핸서 상동체 2(조파리)	-2.54	1.36E-05
Eih4	인핸서 포획 유전자좌 4	2.41	1.24E-05

[0228]

Pbk	PDZ 결합 키나제	-5.63	9.20E-07
Pttg1	뇌하수체 종양-전환 유전자 1	-2.83	2.73E-06
Plac8	태반-특이 8	-2.79	6.64E-03
Pdgfra	헬스판 유래 성장 인자 수용체, 알파 폴리펩티드	-3.16	4.84E-06
Pt4	헬스판 인자 4	-2.96	1.21E-05
Pdgfr	헬스판-유래 성장 인자 C 폴리펩티드	-2.25	2.98E-03
Ptn	플레이오트로핀	-3.21	4.42E-04
Pdgn	포도플라닌	-2.01	3.51E-04
Ptk1	폴로-유사 키나제 I(초파리)	-2.68	5.72E-05
Pola1	폴리머라제(DNA 지칭), 알파 1	-2.37	3.52E-06
Pold2	폴리머라제(DNA 지칭), 델타 2, 조절 서브유닛	-2.02	5.72E-06
Pole	폴리머라제(DNA 지칭), 엡실론	-2.27	5.96E-05
Kcnk2	칼륨 채널, 서브유닛 K, 구성원 2	-2.13	9.52E-05
Prickle1	프리클 상동체 1(초파리)	2.32	1.75E-04
P4ha2	프로콜라겐-프롤린, 2-옥소글루타레이트 4-디옥시게나제 (프롤린 4-히드록실라제), 알파 II 폴리펩티드	-3.54	1.25E-06
Ptger4	프로스타글란딘 H 수용체 4(서브타입 EP4)	2.43	5.12E-05
Pmepa1	진딧물 마킹단 단백질, 안드로젠 유도성 1	-2.35	5.85E-04
Psmb7	프로테아좀(프로솜, 마크로파인) 서브유닛, 베타형 7	-2.17	4.27E-03
Prc1	세포질분열의 단백질 조절 인자 1	-3.06	1.26E-04
Ptprz1	단백질 티로신 포스파타제, 수용체 Z형, 폴리펩티드 1	-3.66	4.43E-05
P2ry12	퓨린 수용체 P2Y, G 단백질 결합 12	-2.55	1.86E-04
Rab34	RAB34, RAS 은코진 패밀리 구성원	2.08	3.95E-05
Racgap1	Rac GTPase 활성화 단백질 1	-2.56	2.92E-05
Rad51ap1	RAD51 관련 단백질 1	-2.61	1.26E-07
Rad51	RAD51 상동체 (S. 세레비지아에)	-2.90	3.33E-06
Ranbp1	RAN 결합 단백질 1	-2.01	6.62E-07
Rfc4	복제 인자 C(활성인자 1) 4	-2.17	4.24E-05
Rbp1	레티놀 결합 단백질 1, 세포	-4.22	1.88E-05
Rrm1	리보뉴클레오타이드 리덕타제 M1	-2.14	1.79E-05
Rrm2	리보뉴클레오타이드 리덕타제 M2	-8.23	1.04E-07
2310616C08Rik	RIKEN cDNA 2310016C08 유전자	-2.14	1.12E-04
2810417H13Rik	RIKEN cDNA 2810417H13 유전자	-3.96	2.33E-07
4930583H14Rik	RIKEN cDNA 4930583H14 유전자	-2.37	1.25E-05
Rbm3	RNA 결합 모티프 단백질 3	-2.20	2.23E-09
Sifn4	스플라넨 4	-3.35	3.42E-03
Stf	Sci/Tal1 종단 유전자좌	-3.15	2.15E-06
Serpinb2 * #	세린(또는 시스테인) 펩티다제 억제제, 클레이드 B, 구성원 2	6.20	1.12E-02
Serpinb6b	세린(또는 시스테인) 펩티다제 억제제, 클레이드 B, 구성원 6b	2.03	1.22E-03
Smyd2	SET 및 MYND 도메인 함유 2	-2.25	6.90E-04
Sh3bgr	SH3-결합 도메인 글루탐산-풍부 단백질	3.33	6.84E-07
Sh3bgr	SH3-결합 도메인 글루탐산-풍부 단백질 유사	-2.02	4.68E-04
Shc3p1	Shc SH2-도메인 결합 단백질 1	-4.72	1.74E-06
Slamf8	SLAM 패밀리 구성원 8	2.81	5.20E-03
Snrpa1	소형 핵 리보뉴클레오타이드 단백질 폴리펩티드 A+	-2.04	1.48E-06
Slc2a5	용질 운반체 패밀리 2(후진 글루코스 수용체),	-3.46	8.15E-07

[0230]

구성원 5		
Sic39a4	용질 운반체 페닐리 39(아연 수송체), 구성원 4	2.44 7.83E-05
Sic6a1	용질 운반체 페닐리 6(신경전달물질 수송체, GABA), 구성원 1	-2.09 5.66E-04
Sparcl1	SPARC-유사 1	-3.23 1.06E-03
Spon1	스폰딘 1, (f-스폰딘) 세포의 기질 단백질	-2.50 9.32E-05
Sox2	SPY-박스 합유 유전자 2	-2.50 5.13E-03
Stab1#	스타빌린 1	-2.64 3.92E-06
Stmn1	스타티린 1	-2.52 5.52E-05
Smc2	염색체 구조 유지 2	-2.87 7.68E-05
Smc4	염색체 구조 유지 4	-3.20 2.26E-04
Sl14	발암성 억제 14(결장암종)	2.47 4.21E-06
Tiparp	TCDD-유도성 폴리(ADP-리보스) 폴리머라제	-2.06 1.25E-03
Tnc	테나신 C	-2.56 2.48E-03
Tk1	티미딘 키나제 1	-3.39 1.24E-07
Tipin	영구 상호작용 단백질	-2.50 6.24E-06
Tip2	조직 인자 경로 억제제 2	-2.60 3.99E-03
Timp1	메탈로프로테이나제의 조직 억제제 1	-2.07 1.64E-04
Top2a	토포이소머라제 (DNA) II 알파	-2.11 2.13E-05
Topbp1	토포이소머라제 (DNA) II 결합 단백질 1	-2.37 9.96E-06
Tpx2	TPX2, 미세소관-관련 단백질 상동체 (제노푸스 라레비스)	2.52 1.16E-05
Tcf19	전사 인자 19	-2.32 1.67E-06
Tgfb1	전환 성장 인자, 베타 유도성	-3.23 1.68E-06
Tgm2	트랜스글루타미나제 2, C 폴리펩티드	-2.94 2.86E-03
Tmem119	막횡단 단백질 119	3.12 1.71E-06
Tmem163	막횡단 단백질 163	2.20 5.42E-03
Tips1	모발 비척질 증후군 1(인간)	-2.97 1.68E-07
Trim59	3부분으로 된 모티프-함유 59	-2.78 3.02E-04
Ttk	Ttk 단백질 키나제	2.63 3.35E-05
Tubb2c	튜불린, 베타 2C	-2.13 3.64E-06
Ube2c	유비쿼틴-컨jugatase 효소 E2C	-3.98 1.12E-04
Uhrf1	유비쿼틴-유사, PHD 및 RING 핑거 도메인 함유 1	-2.96 3.73E-07
Ung	우라실 DNA 글리코실라제	-2.50 5.81E-07
Wdhd1	WD 반복부 및 HMG-박스 DNA 결합 단백질 1	-2.01 2.52E-04
Zwisch	즈위치(Zwisch), 동원체 관련, 상동체 (조파리)	-4.32 3.61E-06

* BLZ945에 대한 반응의 라쏘 회귀 서명 성분

관련된 M2 대식세포 관련 유전자

[0231]

[0232]

[0233]

표에서, 하향 조절된 유전자는 음의 "변화 배수" 수치로 제시되어 있는 반면, 상향 조절된 유전자는 양의 값을 가지고 있다. 명목 p 값은 양측 스튜던츠 t-검정으로부터 얻은 값이다.

추가로, 마우스에서 BLZ945 처리된 TAM으로부터 생성된 유전자 서명은 GBM 환자의 차별적인 생존 기간과 관련이 있는 것으로 보였다. 서포트 벡터 머신(SVM: support vector machine) 및 라쏘 서명을 사용하여 더 캔서 진 아틀라스(TCGA: The Cancer Gene Atlas)로부터의 GBM 데이터 및 제2 복합 시리즈의 GBM 데이터 세트를 분석하고, 환자를 'BLZ945' 또는 '비히클' 분류자로 나누었다. 상기 분석을 통해 생존 기간 중간값이 라쏘 서명 사용시 TCGA 전신경 환자에서 10개월인 것에서부터 (도 8c 및 8d) SVM 서명 사용시 복합 데이터 세트에서 31.5개월 (도 8e 및 8f)인 범위로 증가된 것이 밝혀졌다. 흥미롭게도, 생존 기간 증가는 GBM의 다른 서브타입에서는 명백하게 나타나지 않았고, G-CIMP⁺ 전신경 환자의 증폭에도 의존하지 않았다.

표 3

상이한 GBM 집단에서 서포트 벡터 머신(SVM) 및 라쏘 모델에 대한 생존 기간 데이터

군	BLZ945	비허클	생존 기간 중간값	P 값
SVM 복합 신경	49	18	5.42	1.59E-01
SVM 복합 전신경	46	62	31.54	6.86E-04
SVM 복합 중간엽	37	102	-2.25	8.92E-01
SVM 복합 고전형	11	48	0.40	6.67E-01
SVM TCGA 전신경	45	88	7.64	7.27E-03
SVM TCGA 전신경 GCIMP	13	8	-40.60	2.01E-01
SVM TCGA 전신경 비-GCIMP	22	44	-0.76	2.64E-01
SVM TCGA GCIMP	14	8	-35.60	2.03E-01
SVM TCGA 비-GCIMP	83	157	-1.06	7.27E-01
SVM TCGA 신경	23	30	2.84	7.73E-01
SVM TCGA 중간엽	53	99	0.30	7.62E-01
SVM TCGA 고전형	31	66	-3.14	7.71E-01
라쏘 복합 신경	51	14	7.01	6.50E-02
라쏘 복합 전신경	79	29	6.51	4.15E-02
라쏘 복합 중간엽	21	118	1.88	5.55E-01
라쏘 복합 고전형	28	31	0.33	9.68E-01
라쏘 TCGA 전신경	84	49	9.98	5.41E-06
라쏘 TCGA 전신경 GCIMP	20	1	NA	NA
라쏘 TCGA 전신경 비-GCIMP	40	26	10.84	1.40E-02
라쏘 TCGA GCIMP	20	2	-16.13	7.21E-01
라쏘 TCGA 비-GCIMP	100	140	0.10	4.14E-01
라쏘 TCGA 신경	31	22	-5.19	2.77E-02
라쏘 TCGA 중간엽	23	129	0.40	8.35E-01
라쏘 TCGA 고전형	49	48	-1.42	6.34E-01

[0234]

[0235]

관련된 위험비 분석을 통해 TCGA 및 복합 데이터 세트 둘 모두에서의 전신경-특이 생존 기간상의 우위가 입증되었다 (도 8g). 전신경 특이성은 원래는 전신경 GBM을 가장 유사하게 나타내는 신경교종발생의 PDG 모델로부터 생성된 것인 TAM 서명과 일치하였다. 이는 상기 유전자 서명이 화학요법제로 치료받고 있는 대상체, 특히, CSF-1R 억제제로 치료받는 GBM 환자에 대해 유용한 예후 가이드를 제공할 수 있다는 것을 제안한다. 다른 서브타입에 비해 전신경 GBM은 공격성 화학요법 및 방사선요법에 대해 반응하지 않기 때문에, 이들 서명과 관련된 예후 값을 찾는 것이 이러한 환자군에 대하여 중요한 해석상의 잠재능을 가질 수 있다. 관찰된 상관관계에 기초하여, 라쏘 또는 SVM 유전자 서명과 약 80% 이상 유사한 유전자 서명을 보이는, 화학요법을 받고 있는 환자는 화학요법에 대해 긍정적으로 반응할 것으로 예상된다. 특히, 이러한 상관관계는 대상체가 CSF-1R 억제제, 특히, 본원에 기술된 화학식 I의 화합물로 치료받는 경우에 유용할 것으로 예상된다.

표 4

상이한 G-CIMP 및 비-G-CIMP 환자군에서 라쏘 회귀 모델에 대한 위험비 및 관련된 95% 신뢰 구간. G-CIMP는 신경교종 CpG 섬 메틸화 표현형에 상응하는 것이다. P 값은 왈트(Wald) 검정을 사용하여 수득하였다.

계층	환자 집단	모델	위험비	95% CI	P 값
'BLZ945' 라쏘	비-G-CIMP 전신경 *	단변량	0.4921	(0.2766-0.8756)	0.0063
'BLZ945' 라쏘	모든 전신경	단변량	0.3937	(0.2601-0.5961)	9.729e-06
G-CIMP	모든 전신경	단변량	0.3289	(0.1481-0.7304)	0.01367
G-CIMP	모든 전신경	다변량 *	0.4601	(0.1972-1.0733)	0.00783
'BLZ945' 라쏘	모든 전신경	다변량 *	0.4295	(0.2304-0.8007)	0.07244

* 명확하게 G-CIMP 양성이 아닌 메틸화 데이터를 가지는 전신경 환자 세트 (총 133명의 전신경 TCGA 환자 중 67명). ** G-CIMP 및 'BLZ945' 분류 계층을 이용한 다변량 콕스 비례 위험 모델.

[0236]

표 5

상이한 환자 데이터 세트에서 라쏘 회귀 모델에 대한 위험비. P 값은 월트 검정을 사용하여 수득하였다. 전신경 서브타입으로부터의 위험비만이 오직 통계학상 유의적이었다.

군	위험비	95% CI	P값
TCGA-전신경	0.29	(0.17-0.50)	6.32E-06
TCGA-고전형	1.28	(0.73-2.26)	3.89E-01
TCGA-중간형	0.93	(0.49-1.72)	8.07E-01
TCGA-신경	1.93	(0.83-4.46)	1.25E-01
복합-전신경	0.44	(0.25-0.79)	5.97E-03
복합-고전형	1.01	(0.47-2.17)	9.79E-01
복합-중간형	1.02	(0.54-1.94)	9.43E-01
복합-신경	0.46	(0.22-1.01)	5.23E-02

[0237]

[0238] 사용된 방법 및 물질

[0239] 마우스

[0240] 모든 동물 연구는 메모리얼 슬로언 케터링 암 센터의 동물 실험 윤리 위원회(Institutional Animal Care and Use Committee of Memorial Sloan-Kettering Cancer Center) 승인을 받았다. 네스틴-Tv-a;Ink4a/Arf-/- 마우스 모델 (혼합 계통 배경)은 앞서 기술된 바 있다 (문헌 [E. Tchougounova et al., Oncogene 26, 6289 (2007)] 참조). 야생형 (WT) C57BL/6 마우스 및 β-액틴-GFP (C57BL/6) 마우스를 각각 찰스 리버 라보라토리즈 (Charles River Laboratories) 및 잭슨 라보라토리즈(Jackson Laboratories)로부터 구입하고, 이를 또한 본 발명자들의 동물 시설 내에서 사육하였다.

[0241] 두개내 주사

[0242] 성체 마우스에서 RCAS-PDGF-B-HA를 이용하여 종양을 개시시키는 것은 앞서 기술된 바 있다 (문헌 [A. H. Shih et al., Cancer Res 64, 4783 (2004)]). 간략하면, 마우스를 10 mg/ml 케타민/1 mg/ml 크실라진으로 완전히 마취시키고, 수술 부위에 국부 마취제인 0.25% 부피마카인 50 μl를 피하 주사하였다. 고정 정위 장치 (스톨팅 (Stoelting))를 사용하여 5-6주령된 마우스의 두개내에 2 x 10⁵ 개의 DF-1:RCAS-PDGF-B-HA 세포를 함유하는 것으로 1 μl 용량으로 주사하였다. 대략 정수리점으로부터 측면으로 1.5 mm 및 미측으로 1 mm되는 지점에 2 mm 깊이로 우측 전두 피질에 주사하였다.

[0243] 유세포 측정법으로 분류된 세포 집단에서 세포 유형에 특이적인 CSF-1 및 CSF-1R 발현에 관하여 조사하기 위해, 앞서 기술된 바와 같이 (문헌 [E. I. Fomchenko et al., PLoS ONE 6, e20605 (2011)]), RCAS-PDGF-B-HA-SV40-eGFP (RCAS-PDGF-GFP)를 이용하여 마우스에서 종양을 개시시켰다. 생후 2일째인 네스틴-Tv-a;Ink4a/Arf-/- 새끼에 1 μl의 DF-1:RCAS-PDGF-B-GFP 세포를 눈과 귀 사이의 좌측 피질에 주사하였다.

[0244] BLZ945 억제제 및 처리

[0245] CSF-1R 억제제 BLZ945를 12.5 mg/ml의 농도로 20% 캡티솔 중에서 제제화하였다. 비히클 대조군인 20% 캡티솔을 같은 방식으로 프로세싱하였다. BLZ945 연구를 위해, 1일 1회에 걸쳐 경구 위관 영양법을 통해 200 mg/kg BLZ945 또는 비히클 (20% 캡티솔)을 마우스에 투여하였다.

[0246] 약물이 혈액-뇌 장벽을 통과할 수 있는지 여부를 측정하기 위해, 종양을 보유하는 마우스를 단일 용량의 BLZ945로 처리하고, 처리 후 다른 시점에 희생시켰다. 후속되는 조직 중 BLZ945 농도에 관한 분석을 위해 혈장, 및 뇌의 좌반구 (반대측) 및 우반구 (종양 보유)를 액체 질소에서 급속 냉동시켰다. 장기간에 걸친 생존 기간 연구에서, RCAS-PDGF-B-HA 주사 후 17일/2.5주째에 투여를 시작하였다. 고정 시점 연구를 위해, 앞서 기술된 바와 같이 (문헌 [Transl Oncol 2, 89 (2009)]), RCAS-PDGF-B-HA 주사 후 4-5주째에 마우스에 대해 MRI 스캔을 수행하였다.

[0247] 종양 부피를 측정하기 위해, T2 가중 영상에 경계를 정하여 관심의 대상이 되는 부위 (ROI)를 국한하고, 그의 상응하는 면적 (mm²)에 슬라이스 높이 0.7 mm를 곱하였다. 전체 종양 부피는 각 슬라이스의 ROI 부피의 총합이며, 종양이 출현한 첫번째 및 마지막 슬라이스에 대한 부피를 이등분하여 사다리꼴 부피의 근사치를 구하였다. 종양 부피가 4.5-40 mm³ 범위일 때, 동물을 무작위적으로 처리군으로 지정하였다. 40 mm³보다 더 큰 종양을 가지

는 마우스로 이루어진 제3 코호트 또한 BLZ945로 처리하였다 (BLZ945 거대로 표시). 이들 마우스는 시험 종료점까지 생존이 불가능할 수도 있는 바, 크기가 매치되는 비히클 처리 코호트는 보다 큰 거대의 출발 중량 부하량을 가지는 상기 코호트에 포함시키지 않았다.

[0248] 마우스 희생 및 조직 수거

[0249] 도면 범례에 기술되어 있는 바와 같은 정의된 시점에, 또는 마우스가 불량한 그루밍 징후, 무기력, 체중 감소, 등 구부림, 대두증, 또는 발작을 비롯한, 그의 증양으로부터 유발되는 증상을 보이게 되었을 때, 마우스를 안락시켰다.

[0250] 조직을 단리시켜 액체 질소 중에서 급속 냉동시키기 위해, 이산화탄소 질식사에 의해 안락사시키거나, 또는 아베르틴 (2,2,2-트리브로모에탄올, 시그마(Sigma))로 완전하게 마취시키고, 경추 탈구 시킨 후, 조직을 수거하였다. 유세포 측정을 위해, 마우스를 아베르틴으로 완전하게 마취시키고, 20 ml의 PBS를 경심 관류시켰다. 이어서, 뇌를 단리시키고, 주변의 정상 조직으로부터 증양을 거대절개하였다. 증식 분석을 위해, 희생시키기 2시간 전에 100 mg/g의 브로모데옥시우리딘 (BrdU; 시그마)을 마우스 복강내로 주사하였다. 냉동 조직학적 방법을 위해 조직을 단리시키기 위해서, 마우스를 아베르틴으로 완전하게 마취시키고, 10 ml의 PBS를 경심 관류시킨 후, PBS 중 4% 파라포름알데히드 (PFA) 10 ml를 경심 관류시켰다. 다른 조직은 4°C에서 30% 수크로스 중에서 냉동 보관하면서, 뇌는 4°C에서 밤새도록 PFA 중에 후고정시켰다. 후고정시킨 후, 이어서, 뇌를 30% 수크로스로 옮겨 놓고, 뇌가 완전하게 평형화되고, 튜브 바닥으로 가라앉을 때까지 (전형적으로 2 내지 3일) 4°C에서 인큐베이션시켰다. 이어서, 모든 조직을 OCT (티슈-텍(Tissue-Tek))에 포매시키고, 저온 유지 장치에 보관된 10 μm의 조직 절편을 후속의 모든 분석에 사용하였다.

[0251] 조직학적 방법, 면역조직화학법, 및 분석

[0252] 증양의 악성을 등급화하기 위해, 헤마톡실린 및 에오신 (H&E) 염색법을 수행하고, 독립된 신경 병리학자에 의해 조직을 맹검 방식으로 점수화하였다.

[0253] 면역형광을 위해, 10 μm 두께의 냉동 절편을 실온에서 해동시키고, 건조시킨 후, PBS로 세척하였다. 표준 염색 프로토콜의 경우, 조직 절편을 실온에서 1시간 이상 동안, 또는 4°C에서 밤새도록 PBS 중 0.5% PNB에서 차단시킨 후, 실온에서 2시간 동안, 또는 4°C에서 밤새도록 0.25% PNB 중 1차 항체 중에서 인큐베이션시켰다. 1차 항체에 관한 정보 및 희석률은 하기 표 6에 열거되어 있다. 이어서, 절편을 PBS 중에서 세척하고, 실온에서 1시간 동안 0.25% PNB 중 1:500의 희석률로 적절한 형광단-컨쥬게이트된 2차 항체 (몰레큘러 프로브스(Molecular Probes))와 함께 인큐베이션시켰다. PBS 중에서 세척시킨 후, 조직 절편을 DAPI (PBS 중 1:5,000으로 희석된 5 mg/ml 스톱)로 대비 염색시킨 후, 프로롱 골드 안티페이드(ProLong Gold Antifade) 봉입 매질 (인비트로겐 (Invitrogen))으로 봉입하였다.

[0254] 혈관신생 및 증식 분석을 위해, 먼저, 항원 비차폐 용액 (증류수 중 0.94% v/v; 벡터 라보라토리즈(Vector Laboratories)) 중에 침지시키고, 반전력에서 10분 동안 마이크로웨이빙한 후, 30분 이상 동안 실온으로 냉각시킴으로써 조직 절편에 대해 시트레이트 완충제 기반 항원 회수를 수행하였다. 이어서, 혈관신생 분석을 위해, 조직을 PBS 중에서 세척하고, 실온에서 1시간 동안 제조사의 설명서에 따라 마우스 Ig 차단 시약 (벡터 라보라토리즈)으로 차단하였다. 증식 분석을 위해, 항원 회수 후, 조직 절편을 실온에서 15분 동안 2 M HCl과 함께 인큐베이션시켜 DNA를 변성시킨 후, 5분 동안 0.1 M 붕산나트륨 중화 완충제 (pH 8.5)에 놓았다. PBS로 세척한 후, 표준 프로토콜에 따라 남은 염색을 수행하였다.

[0255] 포식 작용 분석을 위한 염색을 위해, 10 μm 두께의 냉동 절편을 실온에서 해동시키고, 건조시킨 후, PBS로 세척하였다. 조직 절편을 실온에서 1시간 이상 동안 PBS 중 0.5% PNB에서 차단시킨 후, 4°C에서 밤새도록 0.5% PNB 중 1:500으로 희석된 토끼 항-절단형 카스파제-3 1차 항체 중에서 인큐베이션시켰다. 다음날, 슬라이드를 PBS 중에서 5분 동안 6회에 걸쳐 세척한 후, 실온에서 1시간 동안 염소-항-토끼 알렉사568 2차 항체 (0.5% PNB 중 1:500)와 함께 인큐베이션시켰다. 이어서, 조직 절편을 PBS 중에서 5분 동안 6회에 걸쳐 세척하고, PBS 중 5% 당나귀 혈청, 3% 우혈청 알부민, 및 0.5% PNB로 이루어진 새 완충제 중 4°C에서 밤새도록 차단시켰다. 다음날, 슬라이드를, PBS 중 5% 당나귀 혈청, 3% 우혈청 알부민, 및 0.5% PNB 중에 희석된 하기 세트: 1차 항체: 토끼 항-Olig2 (1:200) 및 래트 항-CD11b (1:200)와 함께 실온에서 2시간 동안 인큐베이션시켰다. 슬라이드를 PBS 중에서 5분 동안 6회에 걸쳐 세척한 후, 실온에서 1시간 동안 0.5% PNB 중 당나귀-항-토끼 알렉사647 (1:500) 및 당나귀-항-래트 알렉사488 (1:500) 2차 항체와 함께 인큐베이션시켰다. 이어서, 조직 절편을 PBS 중에서 5분 동안 4회에 걸쳐 세척한 후, 5분 동안 DAPI (PBS 중 1:5,000으로 희석된 5 mg/mL 스톱)로 염색하고, 5분 동

안 PBS 중에서 2회 이상 세척하고, 프로롱 골드 안티페이트 봉입 매질 (인비트로젠)으로 봉입하였다. 처음에 시트레이트 완충제 기반 항원 회수를 부가하면서, CSF-1R (제1 1차 항체) 및 Iba1 (제2 1차 항체)에 대한 공염색 또한 동일한 방식으로 일련으로 수행하였다.

- [0256] 아포토(Apoptome)이 장착된 칼자이스 악시오이미저 Z1(Carl Zeiss Axioimager Z1) 현미경하에 조직 절편을 시각화하였다. 앞서 기술된 바와 같이 (문헌 [Journal Immunol Methods 237, 39 (2000)]), 티슈퀘스트(TissueQuest) 분석용 소프트웨어를 사용하여 면역형광 염색, 세포 개수, 증식, 아포토시스 분석, 및 동시 국소화 연구를 수행하였다.
- [0257] 혈관신생 분석을 위해 염색된 신경교종으로부터의 조직 절편에 대한 개요는 개별 200x 영상을 함께 스티칭함으로써 티슈지노스틱스(TissueGnostics) 획득 소프트웨어에 의해 작성하였다. 앞서 기술된 바와 같이 (문헌 [V. Gocheva, et al., Biol Chem 391, 937 (2010)]), 메타모르프(MetaMorph) (몰레큘러 디바이시스(Molecular Devices))를 사용하여 혈관신생에 대한 모든 파라미터를 정량화하였다.
- [0258] 포식 작용 분석을 위해, 세포가 확실하게 동일한 광학부에 존재하도록 63x 유침용 대물 렌즈 (총 확대 배율 630x) 및 아포토를 사용하여 중앙내에서부터의 15개의 무작위로 선택된 시야를 획득하였다. 볼로시티(Volocity) (퍼킨엘머(PerkinElmer))를 사용하여 양성 세포를 수동으로 계수하고, DAPI+ 핵의 존재에 의해 구별되었다. 세포질 절단형 카스파제-3 (CC3)+ 염색 및 응축된 핵이 있는 것을 아포토시스 세포인 것으로 하여 계수하였다. 세포가 세포 경계의 ⅓ 이상을 둘러싸는 인접한 CD11b+ 고리에 의해 둘러싸여 있을 때, 이때 세포는 대식세포에 의해 포식된 것으로 간주하였다. 분석된 마우스의 마리수는 도면 범례에 명시되어 있다.
- [0259] 단백질 단리 및 웨스턴 블롯팅
- [0260] 마우스를 BLZ945 또는 비히클로 처리하고, 최종 투여 후 1시간째에 희생시키고, 종양을 수거하였다. 샘플을 앞서 기술된 바와 같이 생화학적으로 분획화하였다. 시냅톰 막 분획을 NP-40 용해 완충제 (0.5% NP-40, 50 mM 트리스-HCl [pH 7.5], 50 mM NaCl, 1 x 완전 미니 프로테아제 억제제 칵테일 (로슈(Roche)), 1 x PhosSTOP 포스파타제 억제제 칵테일 (로슈)) 중에서 용해시키고, BCA 검정법 (피어스(Pierce))를 사용하여 단백질을 정량화하였다. 단백질 용해물 (90 µg/레인)을 SDS-PAGE 겔에 로딩하고, 면역블롯팅을 위한 PVDF 막으로 옮겨 놓았다.
- [0261] 포스포-CSF-1R Y721 (1:1,000; 셀 시그널링 테크놀로지(Cell Signaling Technology)), CSF-1R (1:1,000; 산타 크루즈 바이오테크놀로지(Santa Cruz Biotechnology)), 또는 GAPDH (1:1,000; 셀 시그널링 테크놀로지)에 대한 항체를 사용하여 막을 프로빙하고, 화학발광 검출 (밀링포어(Millipore))을 이용하여 HRP-컨쥬게이트된 항-토끼 (잭슨 이뮤노리서치(Jackson Immunoresearch)) 항체를 사용함으로써 검출하였다. 이미지J(ImageJ) 소프트웨어에서 겔 분석 모듈을 이용하여 동적 범위에서 웨스턴 블롯으로부터의 밴드를 정량화하였다.
- [0262] 12시간 동안 CSF-1의 부재하에 1차 골수 유래 대식세포 (BMDM)를 배양한 후, 67 nM BLZ945의 존재 또는 부재하에서 도 S2에 명시되어 있는 시점에 CSF-1 (10 ng/ml)로 자극시켰다. NP40 용해 완충제를 사용하여 전체 단백질 용해물을 단리시키고, 상기 기술되어 있는 바와 같이 웨스턴 블롯에 의해 검출하였다.
- [0263] 단일 세포 현탁액 제조 및 유세포 측정
- [0264] 유세포 측정 분석 또는 분류에 의해 뇌 대식세포 집단을 조사하기 위하여, 얼스 밸런스드 솔트 솔루션(Earl's Balanced Salt Solution) 중에 희석된 5 ml의 파파인 분해 용액 (0.94 mg/ml 파파인 [워싱턴(Worthington)], 0.48 mM EDTA, 0.18 mg/ml N아세트-L-시스테인 [시그마], 0.06 mg/ml DNase I [시그마])과 함께 인큐베이션시킴으로써 종양을 단일 세포 현탁액으로 분해하고, 실온에서 30분 이상 동안 활성화시켰다. 분해시킨 후, 2 ml의 0.71 mg/ml 오보뮤코이드 (워싱턴)를 첨가하여 효소를 불활성화시켰다. 이어서, 세포 현탁액을 40 µm 메쉬를 통과시켜 분해되지 않은 조직을 제거하고, FACS 완충제 (PBS 중 1% IgG 무함유 BSA [잭슨 이뮤노리서치])로 세척하고, 750 rpm인 저속으로 원심분리하여 (소르발 레전드 RT(Sorvall Legend RT)) 파편을 제거하고, 세포 펠릿을 수득하였다. 다수의 면역 세포 에피토프는 파파인에 대해 감수성을 띠는 바, 유세포 측정 분석에 의해 면역 세포 침윤을 조사하기 위해, 칼슘 및 마그네슘을 함유하는 1 x 헵크스 밸런스드 솔트 솔루션(HBSS: Hanks Balanced Salt Solution) 중의 5 mL의 1.5 mg/ml 콜라게나제 III (워싱턴) 및 0.06 mg/mL DNase I와 함께 37°C에서 10분 동안 인큐베이션시킴으로써 종양을 단일 세포 현탁액으로 분해하였다.
- [0265] 이어서, 세포 현탁액을 PBS로 세척하고, 40 µm 메쉬를 통과시켜 분해되지 않은 조직을 제거하였다. 미엘린 파편을 제거하기 위해, 세포 펠릿을 스톱 등장성 퍼콜(Percoll) (90% 퍼콜 [시그마], 10% 10x HBSS)로부터 제조된, 실온의 25% 퍼콜 15 ml 중에 재현탁시킨 후, 액셀러레이터 및 브레이크를 1로 설정해 놓고, 1,500 rpm으로 15분 동안 회전시켰다 (소르발 레전드 RT). 이어서, 세포 펠릿을 1 x HBSS로 세척한 후, FACS 완충제 중

에 재현탁시켰다. 계수한 후, 세포를 4℃에서 15분 이상 동안 매 10⁶개의 세포당 1 μl의 Fc 블록과 함께 인큐베이션시켰다. 이어서, 세포를 4℃에서 10분 동안 적절한 항체로 염색시키고, FACS 완충제로 세척하고, 생/사 세포 배제를 위해 DAPI를 함유하는 FACS 완충제 (5 mg/ml, 1:5,000으로 희석) 중에 재현탁시켰다. 유세포 측정을 위해 사용된 항체는 표 6에 열거되어 있다.

표 6

항체 및 공급업체 목록

항체	클론	업체	형광단(들)	희석률
CD45	30-F11	BD 파르민젠 (BD Pharmingen)	FITC, APC, PE-Cy7	1:100 - 1:200
CD3e	145-2C11	BD 파르민젠	PE-Cy7	1:250
Gr-1	RB6-8C5	BD 파르민젠	FITC	1:200
CD4	GK1.5	BD 파르민젠	PE	1:1000
CD11b	M1/70	BD 파르민젠	A488, APC, PE	1:200
Ly6G	1A8	BD 파르민젠	PE-Cy7	1:2000
F4/80	Cl.A3-1	세로텍크(Serotec)	PE	1:50
CD8a	53-6.7	바이올레전드 (Biolegend)	A488	1:1000
CD19	6D5	바이올레전드	PE	1:2000
NK1.1	PK136	바이올레전드	APC	1:1000
CD206	MR5D3	바이올레전드	A488	1:50

[0266]

[0267]

분석을 위해, 샘플을 BD LSR II (벡톤 디크스테인(Becton Dickstein)) 상에서 전개시키고, 후속되는 보상 및 게이팅 모두 플로우조(FlowJo) 분석 소프트웨어 (트리스타(TreeStar))를 이용하여 수행하였다. 분류를 위해, 샘플을 BD FACS아리아(BD FACSAria) (벡톤 디크스테인) 세포 분류기 상에서 전개시키고, 세포를 FACS 완충제 내로 수집하였다. 이어서, 세포를 원심분리하고, 500 μl 트리아졸(Trizol) (인비트로젠) 중에 재현탁시킨 후, 액체 질소 중에서 급속 냉동시키고, -80℃에서 보관하였다.

[0268]

마우스 1차 신경교종 배양물, 신경구, 및 신경교종 세포주 유도

[0269]

상기 기술된 바와 같이 37℃에서 8-12분 동안 인큐베이션시킴으로써 거대절개된 종양을 단일 세포 현탁액으로 분해하였다. 세포 현탁액을 누럴 스템 셀(NSC: Neural Stem Cell) 기초 배지 (스템 셀 테크놀로지스(Stem Cell Technologies))로 세척하고, 저속으로 (750 rpm, 소르발 레전드 RT) 원심분리하여 파편을 제거하였다. 마우스 1차 신경교종 배양물을 유도하기 위해, 세포 펠렛을 10% FBS를 함유하는 DMEM (기브코(Gibco)) 중에 재현탁시켰다. 상기 1차 배양물을 조기 계대접종 (P2-P3)에 사용하였으며, 이는 면역형광 염색에 의해 측정된 바와 같이, 종양 세포, 대식세포, 및 성상세포를 포함하는, 신경교종에서 발견되는 상이한 세포 유형의 혼합물을 함유하였다. 1차 신경교종 배양물을 폴리-L-리신으로 코팅된 커버슬립 (BD 바이오코트(BD Biocoat)) 상에서 24시간 동안 성장시켰다. 이어서, 세포를 4℃에서 밤새도록 0.1 M 포스페이트 완충제 중 4% PFA로 고정시키고, 5분 동안 0.1% 트리톤-X로 투과화시키고, 1시간 이상 동안 0.5% PNB로 차단시켰다. CD11b (1:200), 네스틴 (1:500) 및 GFAP (1:1,000)의 면역형광 염색에 의해 대식세포, 종양 세포 및 성상세포 각각의 존재에 대해 조사하였다 (하기 표 7).

표 7

염색에 사용된 항체 목록

항체	클론	업체	희석률
염소 항-마우스 CD31	--	R&D 시스템즈(R&D Systems)	1:100
마우스 항-인간 평활근 액틴 (SMA)	1A4	다코시토크메이션 (DakoCytomation)	1:100
토끼 항-절단형 카스파제-3 (Asp175)(CC3)	--	셀 시그널링 테크놀로지	1:500
토끼 항-인간 CSF-1R	C-20	산타 크루즈(Santa Cruz)	1:200
토끼 항-Iba1	--	와코(Wako)	1:1000
토끼 항-녹색 형광 단백질(GFP)	--	몰레큘러 프로브스	1:200
토끼 항-Olig2	--	밀리포어(Millipore)/케미콘(Chemicon)	1:200
마우스 항-라트 네스틴	--	BD 파르민젠	1:500
라트 항-마우스 CD11b	M170	BD 파르민젠	1:200
라트 항-BrdU	BU175(ICR1)	세로텍크	1:200
라트 항-마우스 CD68	FA-11	세로텍크	1:1000
닭 항-GFAP	--	압캠(Abcam)	1:1000

[0270]

[0271]

신경구 형성을 위해, 마우스 NSC 기초 배지, NSC 증식 보충제, 10 ng/ml EGF, 20 ng/ml 염기성-FGF 및 1 mg/ml 헤파린으로 구성된 신경구 배지 (스텝 셀 테크놀로지스) 중에 세포 펠릿을 재현탁시켰다. 2주 동안 매 72시간 마다 새 배지를 첨가하였다. 1차 신경구를 수집하고, 기계적으로 분해하여 단일 세포 현탁액으로 만들고, 일련의 계대집중에 의해 증식시켰다. 신경교종 세포주를 생성하기 위해, 2차 신경구를 단리 세포 현탁액으로 해리시키고, DMEM+10% FBS 중에서 단일층으로서 배양하였다. 독립된 마우스로부터 유래된 다중 신경교종 세포주를 얻고, 본원에서는 이를 GBM1-4로 나타내었다. 앞서 기술된 바와 같이 (문헌 [O. Florey, et al., *Nat Cell Biol* 13, 1335 (2011)]), 신경교종 세포를 pBabe-H2B-mCherry 구축물과 함께 감염시켰다.

[0272]

골수 유래 대식세포 (BMDM) 단리

[0273]

골수를 단리시킨 후, 대식세포를 유도하기 위해, C57BL/6 WT, C57BL/6 β-액틴-GFP 또는 네스틴-Tv-a;Ink4a/Arf-/- 마우스를 아베르틴 (시그마)으로 마취시킨 후, 경추 탈구에 의해 희생시켰다. 멸균 조건하에서 양쪽 다리 모두로부터 대퇴골 및 경골을 수거하고, 플라싱하였다. 40 μm 스트레이너를 통해 상기 골수를 통과시키고, 10 ng/ml 재조합 마우스 CSF-1 (R&D 시스템즈)을 포함하는 30 ml 테플론(Teflon)® 백 (퍼마라이프 (PermaLife) PL-30) 중에서 배양하였다. 골수 세포를 7일 동안 테플론® 백에서 배양하였으며, 이들에 한번씩 기존 배지를 CSF-1을 함유하는 신선한 배지로 교체하여 대식세포의 분화를 유도하였다.

[0274]

추가적 세포주 U-87 MG (HTB-14) 신경교종 및 CRL-2467 소교세포주는 ATCC로부터 구입하였다. U-87 MG 세포주를 DMEM+10% FBS 중에서 배양하였다. CRL-2467 세포주를 30 ng/ml 재조합 마우스 CSF-1과 함께 DMEM+10% FBS 중에서 배양하였다.

[0275]

신경교종 세포-조절 배지 (GCM) 실험 24시간 동안 무혈청 배지 중에서 성장된 신경교종 종양 세포주에 의해 조절된 배지를 0.22 μm 필터를 통과시켜 세포 과편을 제거하고, 본원에서는 이를 신경교종 세포-조절 배지 (GCM)라 지칭하였다. GCM을 사용하여 분화된 C57BL/6 WT 또는 β-액틴-GFP+ BMDM을 자극시켰다. 대조군 대식세포에는 10% FBS 및 10 ng/ml 재조합 마우스 CSF-1을 함유하는 신선한 배지를 제공하였다. 제시되었을 때, 분화된 BMDM을 비히클로서 DMSO, 또는 67 nM BLZ945, 670 nM BLZ945를 함유하는 GCM 중에서, 또는 10 ng/ml 마우스 재조합 CSF-1 및 10 ng/ml IL-4 (R&D 시스템즈)를 함유하는 표준 배지 중에서 실험 분석하기 전 24시간 또는 48시간 동안 배양하였다.

[0276]

유세포 측정법에 의한 Mrc1/CD206 발현 분석

[0277]

(종양 세포, TAM, 정상세포 등의 혼합 집단을 함유하는) 마우스 1차 신경교종 배양물을 위해, BLZ945, 또는 비히클로서 DMSO의 존재하에 DMEM+10% FBS 중에서 1 x 10⁶개의 세포를 배양하였다. BMDM을 위해, BLZ945, 또는 비히클로서 DMSO의 존재하에 재조합 마우스 CSF-1로 보충된 DMEM 또는 GCM 중에서 1 x 10⁶개의 세포를 배양하였다. 48시간 후, 세포를 스크램핑하고, FACS 완충제로 세척하였다. 세포를 계수하고, 4°C에서 15분 이상 동안

10⁶개의 세포당 1 μ l의 Fc 블록 (BD 파르민젠)과 함께 인큐베이션시켰다. 이어서, 세포를 4°C에서 10분 동안 CD45 및 CD11b 항체로 염색하고, FACS 완충제로 세척하였다. 세포를 고정시키고, BD 시토폭스/시토펜(BD Cytotfix/Cytoperm)TM 키트 (BD 바이오사이언시즈(BD Biosciences))를 이용하여 제조사의 설명서에 따라 투과화시켰다. 이어서, 세포를 항-CD206 항체로 염색하였다. 분석을 위해, 샘플을 BD LSR II (벡톤 디스테인) 상에서 전개시키고, 후속되는 보상 및 게이팅 모두 플로우조 분석 소프트웨어 (트리스타)를 이용하여 수행하였다.

[0278] 세포 주기 분석

[0279] 670 nM BLZ945 또는 비히클로서 DMSO의 존재하에 대조군 또는 β -액틴-GFP+ 마우스로부터 유래된, GCM으로 사전 자극을 받은 대식세포를 (상기와 같이 유래된 세포주로부터의) 1 x 10⁵개의 혈청 기아 mCherry-양성 신경교종 세포와 함께 1:1의 비율로 48시간 동안 공동 배양하였다. 트립신 처리된 공동 배양 세포를 수집한 후, 추가 배지 중에서 웰을 세정하고, 세포 배양 디쉬에 밀착되어 있는 대식세포 모두를 확실하게 수거할 수 있도록 상기 부피물을 수집하였다. 이어서, 샘플을 FACS 완충제로 1회 세척한 후, 실온에서 10분 동안 0.1 mg DAPI (인비트로겐)를 함유하는 투과화 완충제 (10 mM PIPES, 0.1 M NaCl, 2 mM MgCl₂, 0.1% 트리톤 X-100 (pH 6.8))중에서 인큐베이션시켰다. UV 레이저 (350-360 nm)를 사용하여 LSR II 유세포 측정기 (BD) 상에서 획득한 후, 세포 주기 분석용 플로우조 딥-젯-폭스(Flow Jo Dean-Jett-Fox) 프로그램을 이용하여 분석하였다.

[0280] 증식 검정

[0281] MTT 세포 증식 키트 (로슈)를 사용하여 세포 성장 속도를 측정하였다. 간략하면, 6.7-6,700 nM의 BLZ945의 존재, 또는 부재하에 세포를 3중으로 96웰 플레이트에 플레이트하였다 (신경교종 세포주의 경우, 1 x 10³개의 세포/웰, 및 BMDM 및 CRL-2467 세포의 경우, 5 x 10³개의 세포/웰). 매 48시간 마다 배지를 교체했다. 달리 지시되지 않는 한, BMDM 및 CRL-2467 세포를 각각 10 ng/ml 및 30 ng/ml 재조합 마우스 CSF-1로 보충하였다. 10 μ l의 MTT 표지화 시약을 각 웰에 첨가한 후, 37°C에서 4시간 동안 인큐베이션시킨 후, 밤새도록 100 μ l MTT 가용화 시약을 첨가하였다. 혼합물을 온화하게 재현탁시키고, 스펙트라맥스(spectraMax) 340pc 플레이트 판독기 (몰레큘러 디바이시스) 상에서 595 nm 및 750 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0282] 2차 신경구 형성 검정

[0283] 1차 신경구를 단일 세포 현탁액으로 분해하고, BLZ945 또는 비히클로서 DMSO의 존재하에 5 x 10³개의 세포를 신경구 배지 중 6웰 플레이트에 플레이트하였다. 매 48시간 마다 배지를 교체했다. 2주 경과 후, 수득된 신경구의 개수를 계수함으로써 2차 신경구 형성을 검정하였다.

[0284] RNA 단리, cDNA 합성 및 정량적 실시간 PCR

[0285] RNA를 트리졸로 단리시키고, DNase 처리하고, cDNA 합성에 0.5 μ g의 RNA를 사용하였다. Cd11b (Mm00434455_m1), Cd68 (Mm03047343_m1), Csf-1 (Mm00432688_m1), Csf-1r (Mm00432689_m1), I134 (Mm00712774_m1), Mrc1 (Mm00485148_m1), 및 Tv-a (주문형)에 대한 택맨(Taqman) 프로프 (어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems))를 qPCR에 사용하였다. 검정은 3중으로 수행하고, 발현을 각 샘플에 대하여 유비쿼틴 C (Mm01201237_m1)로 정규화하였다.

[0286] 마이크로어레이 및 유전자 발현 프로파일링

[0287] 모든 샘플은 MSKCC의 게노믹스 코어 시설에 의해 제조되고 프로세싱되었다. 트리졸을 사용하여 RNA를 단리시키고, 애질런트 바이오애널리저(Agilent Bioanalyzer)에서 수행하여 품질을 평가하였다. 75 ng의 전체 RNA를 역전사시키고, 진침 3' IVT 익스프레스 키트(Genechip 3' IVT Express Kit) (어피메트릭스(Affymetrix))를 사용하여 표지화하였다. 생성된 cRNA를 어피메트릭스 MOE 430A 2.0 칩에 하이브리드화시켰다. GCOS 1.4 (어피메트릭스)를 사용하여 미가공 발현 데이터를 분석하였다. 데이터를 500의 표적 강도로 정규화하여 전체 칩 강도 상의 차이를 해명하였다.

[0288] 마이크로어레이 분석

[0289] 바이오컨덕터 슈트(Bioconductor Suite) 패키지를 사용하여 R로 모든 생물정보 분석을 완료하였다. 'affy' 패키지를 사용하여 로버스트 멀티-어레이 에버리지(RMA: Robust Multi-Array Average) 발현 값을 생성하고, 변위치 정규화를 수행하였다 (문헌 [R. A. Irizarry et al., Nucleic Acids Res 31, e15 (2003)]; [L. Gautier, et al., Bioinformatics 20, 307 (2004)]). '림마(limma)' 패키지 (문헌 [G. K. Smyth, Statistical

Applications in Genetics and Molecular Biology 3, Article 3 (2004)]를 사용하여 비히클 처리된 샘플과, BLZ945 처리된 샘플 사이에 차별적으로 발현된 유전자를 확인하였다. 차별적인 발현은 오류 발견율 10%하에 변화 배수가 ± 2 일 때, 유의적인 것으로 간주하였다. 유전자 세트 농축 분석 (GSEA)을 앞서 기술된 바와 같이 사용하였다 (15). 후속되는 분석 및 인간 데이터 세트와의 비교를 위해, 모든 샘플 전체에 걸쳐 마우스 발현 값을 평균 중심화하였다.

[0290] 유전자 서명 확인을 위한 라쏘 회귀 방법

[0291] 상기 기술된 바와 같이 마우스 발현 데이터를 정규화하고, 평균 중심화하였다. 추가 분석을 위해 차별적으로 발현된 유전자를 사용하였다. 'glmnet' 패키지를 사용하여 비히클 처리된 샘플과 BLZ945 처리된 샘플을 차별화시킬 수 있도록 라쏘 회귀 모델을 연마하였다 (문헌 [J. Friedman, et al., Journal of Statistical Software 33, 1 (2010)]). 라쏘 회귀 조절 파라미터는 4-묵음 교차 검증법에 의해 선택하였다.

[0292] 환자 데이터 세트

[0293] TCGA 데이터 포털로부터 TCGA 발현 데이터를 다운로드 받고, 모든 임상 데이터트는 상기 데이터 포털 <<http://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/tcgaHome2.jsp>>로부터 다운로드 받았다. 램브란트(Rembrandt) 데이터 세트에 대한 임상 및 발현 데이터는 <<https://caintegrator.nci.nih.gov/rembrandt/>>로부터 다운로드 받았다. 프레이제(Freije) (GSE4412), 무라트(Murat) (GSE7696), 및 필립스(Phillips) (GSE4271) 데이터 세트는 NCBI <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>>로부터 다운로드 받았다. 프레이제 데이터 세트의 경우, HGU133B 플랫폼 상의 샘플은 나머지 데이터세트와 최소로 중복되기 때문에, HGU133A 플랫폼 상에서 진행된 샘플만을 고려하였다. 각각의 데이터는 'Affy' 패키지를 사용하여 따로따로 불러왔고, RMA 발현 값을 생성하였다. 모든 환자 전체에 걸쳐 모든 데이터 세트를 변위치 정규화하고, 각 유전자를 평균 중심화하였다.

[0294] 비-TCGA 환자의 서브타입

[0295] 공개적으로 이용가능한 모든 데이터 세트에서 서브타입 특이 생존 기간상의 차이를 조사하기 위해, 앞서 기술된 (문헌 [R. G. Verhaak et al., Cancer Cell 17, 98 (2010)]) 서브타입 분류자를 사용하여 서포트 벡터 머신 (SVM)을 연마하였다. ClacNc 분석을 위해서 버호크(Verhaak)와 동료들이 사용한 840개의 유전자를 이용하여 데이터 세트를 서브세팅하였다. 이어서, 데이터 세트를 상기 기술된 바와 같이 모든 환자 데이터 세트 전체에 걸쳐 존재하는 것으로 여겨지는 유전자에 대하여 서브세팅하였다. 나머지 776개의 유전자를 사용하여 TCGA 데이터 세트로부터의 코어(Core) 샘플에 대해 다중부류 SVM을 연마하였다. '컨랩(kernlab)' 패키지 (문헌 [A. Karatzoglou, et al., J. Statistical Software, 11, 9 (2004)])를 사용함으로써 가우스(Gaussian) 방사형 기저 커널 함수를 이용하여 SVM을 완료하였다. 이어서, SVM을 사용하여 TCGA 환자의 나머지 부분과 공개 데이터 세트의 서브타입을 예측하였다.

[0296] 환자 분류

[0297] 환자를 "비히클" 분류 또는 "BLZ945" 분류로 분류화시키기 위해 마우스 발현 데이터에 대해 SVM을 연마하였다. 모든 데이터 세트 전체에 걸친 공통 유전자, 및 공지된 마우스 상동체를 가지는 유전자에 대하여 환자 발현 데이터를 서브세팅하였다. 유사하게, 모든 환자 샘플 전체에 걸쳐 공통된 인간 상동체를 가지는 유전자에 대하여 마우스 발현 데이터를 서브세팅하였다. 이어서, 마우스 데이터를 '립마' 패키지를 사용하였을 때, 차별적으로 발현되는 것으로 확인된 유전자에 대하여 서브세팅하였다. 이들 차별적으로 발현된 유전자의 인간 상동체에 대하여 인간 데이터를 서브세팅하였다. 이로써, 모든 환자 데이터 세트 전체에 걸쳐 257개의 차별적으로 발현된 유전자에서부터 공지된 인간 상동체를 가지는 206개의 차별적으로 발현된 유전자로 특징 축소가 이루어졌다. 이어서, '컨랩' 패키지를 이용함으로써 바닐라 커널 함수를 이용하여 마우스 발현 데이터에 대해 SVM을 연마하였다. 이어서, 상기 SVM을 이용함으로써 환자를 "비히클" 분류자 또는 "BLZ945" 분류자로 예측하였다.

[0298] 유사 접근법을 이용함으로써 라쏘 회귀 모델로 환자를 분류화하였다. 환자 및 마우스 데이터의 서브세팅은 상기 기술된 것과 동일하였다. '컨랩' 패키지를 사용하는 것 대신, 'glmnet' 패키지를 사용하여 라쏘 회귀 모델을 연마하였다. 이어서, 상기 모델을 사용함으로써 환자 분류를 "비히클" 분류자 또는 "BLZ945" 분류자로 예측하였다. G-CIMP 환자 상태를 상기 기술하는 바와 같이, 환자 메틸화 데이터의 계층 클러스터링에 의해 결정하였다 (문헌 [H. Nounshmehr et al., Cancer Cell 17, 510 (2010)]).

[0299] G-CIMP 상태에 의한 환자 계층화

[0300] 실험상, "BLZ945" 처리 서명이 제공하는 생존 기간상의 우위는 신경교종 CpG 섬 메틸화 표현형 (GCIMP) 환자의

농축에 기인하는 것이 아니었고, 이는 전체 생존 기간의 개선과 관련되는 것으로 앞서 밝혀진 바 있다 (문헌 [Noushmehr]). TCGA 데이터 세트로부터 분석된 453개의 GBM 중, 263개는 또한 게놈 메틸화 데이터를 가졌고, 이를 상기 기술된 바와 같이, 메틸화 클러스터로 분류화하였다. 21명의 G-CIMP 환자 중 20명 (95%)이 "BLZ945" 분류로 분류화되었는데, 이는 G-CIMP 환자 중 BLZ945 샘플이 강하게 농축되었음을 나타내는 것이다. 이러한 농축에도 불구하고, GCIMP 음성인 것으로 알려져 있는 전신경 환자 (총 133명의 전신경 환자 중 67명)에 대한 생존 기간 분석을 통해 "BLZ945" 분류군은 여전히 ~10.8개월 생존 기간 증가를 보였다 ($P=0.014$).

[0301] 또한, "BLZ945" 분류에 의해 입증된 생존 기간 증가는 G-CIMP 환자에 의존한 것이 아니라는 것이 콕스 비례 위험 모델을 통해 입증되었다. BLZ945 서명과 관련된 위험비는 G-CIMP 환자 존재하에서도 부재하에서도 유의적이었다. 또한, G-CIMP 계층에 대한 위험비는, BLZ945 서명이 또한 혼합형 모델에서도 고려될 때에는 유의적이지 않았다. 따라서, 비록 G-CIMP 환자가 모의 "BLZ945" 분류 샘플에 대하여 농축되기는 하였지만, 상기 분류가 제공하는 생존 기간상의 유의함은 GCIMP 상태에 의존하는 것은 아니었다.

[0302] 생존 기간 분석

[0303] R의 "서바이벌" 패키지 (문헌 [T. Therneau, in R package version 2.36-12. (2012)])를 사용하여 생존 기간 분석을 완료하였다. "서바이벌" 패키지로부터의 'coxph' 함수를 사용하여 위험비를 측정하였다. 명시된 바와 같이, 라쏘 회귀 분류 모델, G-CIMP 상태, 또는 그 둘 모두의 확률에 기초하여 환자를 계층화하였다. P 값은 왈트 검정을 사용하여 생성하였다.

[0304] 환자 분석을 위한 플롯

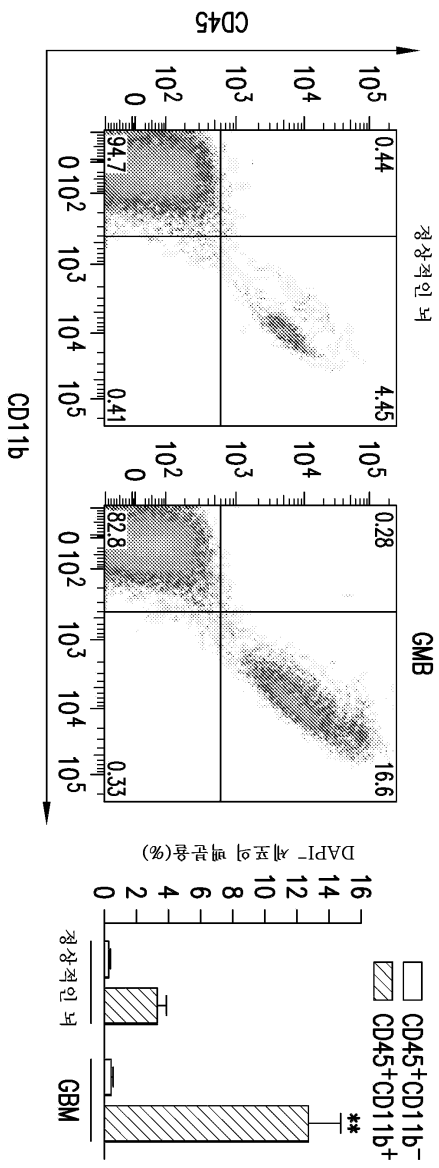
[0305] 'gplots' 패키지 (문헌 [G. R. Warnes et al., R package version 2.10.1, (2011)])를 사용하여 R v 2.14.1로 카플란 마이어(Kaplan-Meier) 생존 곡선, 히트맵 및 화산 도표, 모두 작성하였다. 위험비 포레스트 플롯은 그 래프패드 프리즘 프로5(GraphPad Prism Pro5)로 작성하였다.

[0306] 데이터 표시 및 통계학적 분석

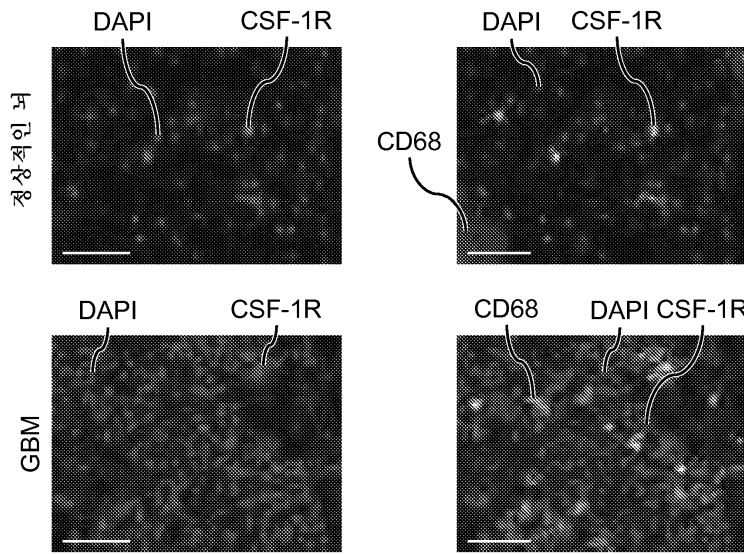
[0307] 데이터는 그래프패드 프리즘 프로5를 사용하여 통계학적 산포도로써, 또는 그들 각각의 표준 오차 (SEM)와 함께 평균으로서 표시하였다. 달리 언급되지 않는 한, 수치 데이터는 비대응 양측 스튜던츠 t-검정에 의해 분석하였다. 생존 곡선의 경우, P 값은 로그 순위 (만텔-콕스(Mantel-Cox)) 검정을 사용하여 수득하고, 조직학적 중앙 등급화를 위해서는 피셔의 정확 검정을 사용하였다. $P = 0.05$ 인 것을 통계학적 유의적인 것으로 간주하였다.

도면

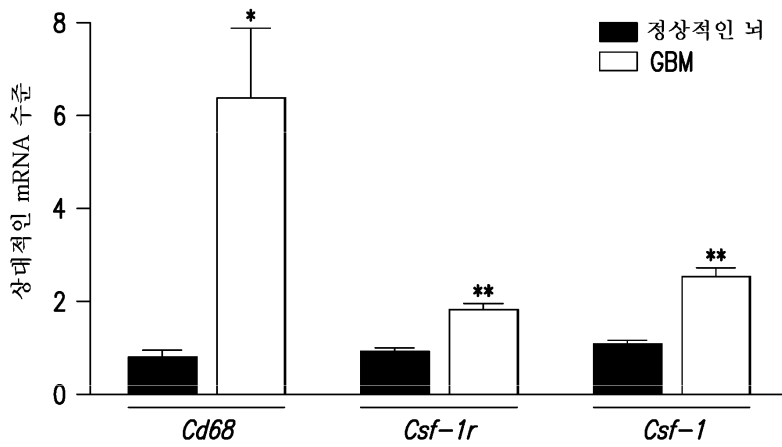
도면1a



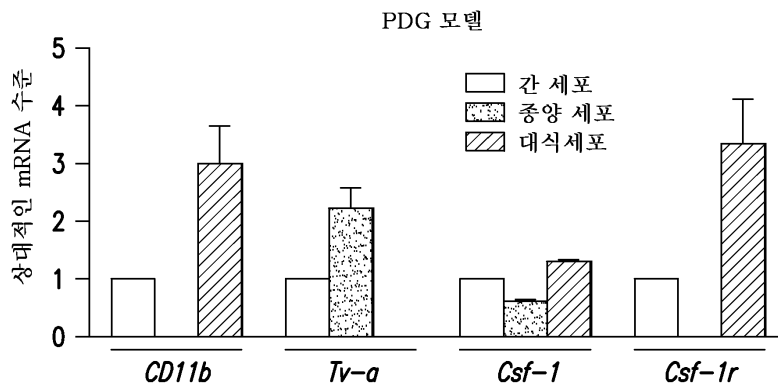
도면1b



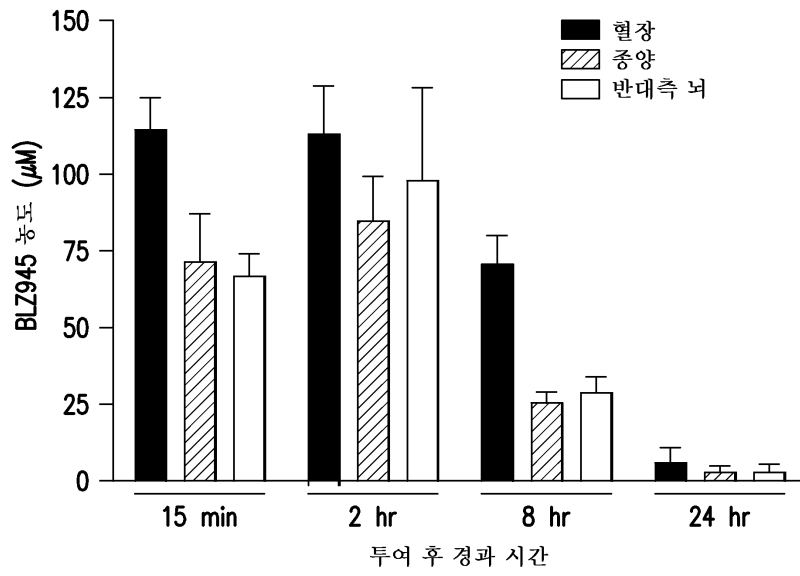
도면1c



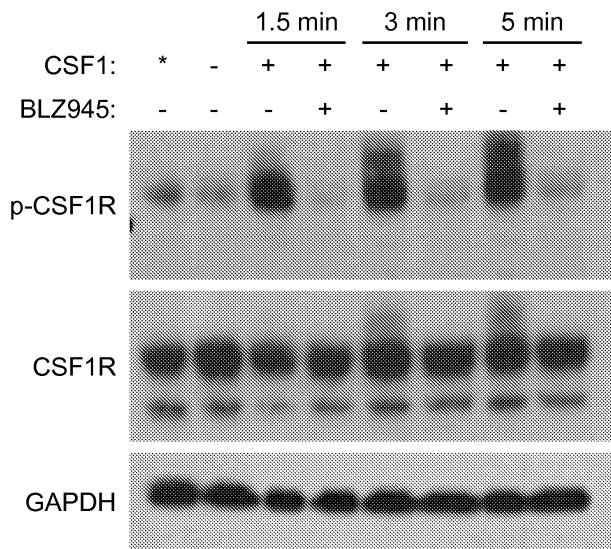
도면1d



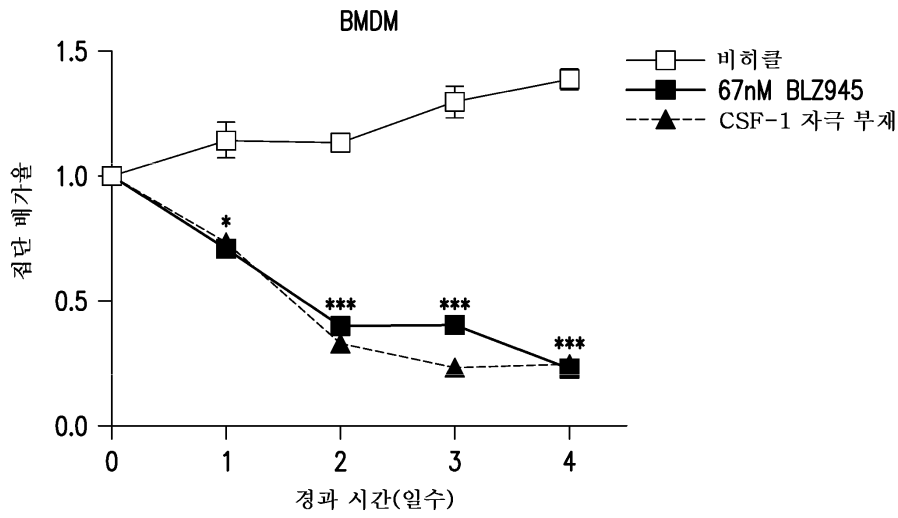
도면2



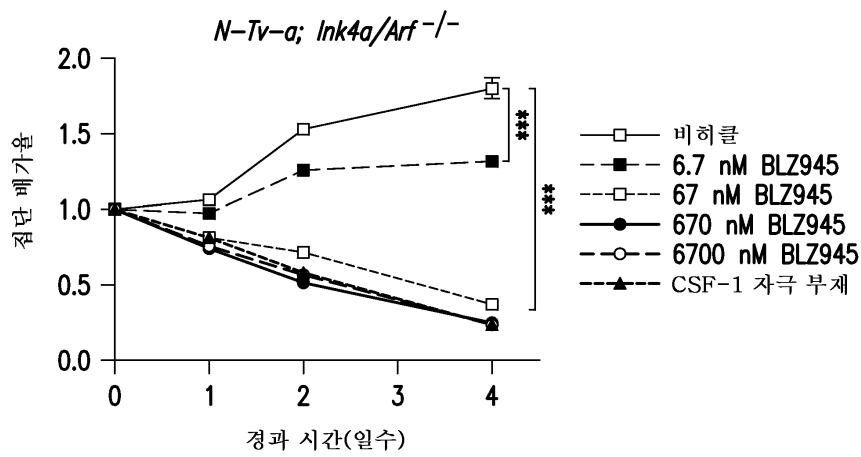
도면3a



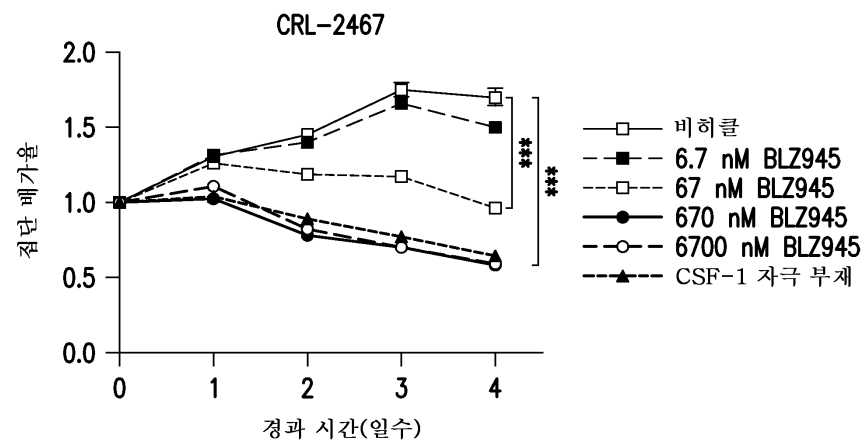
도면3b



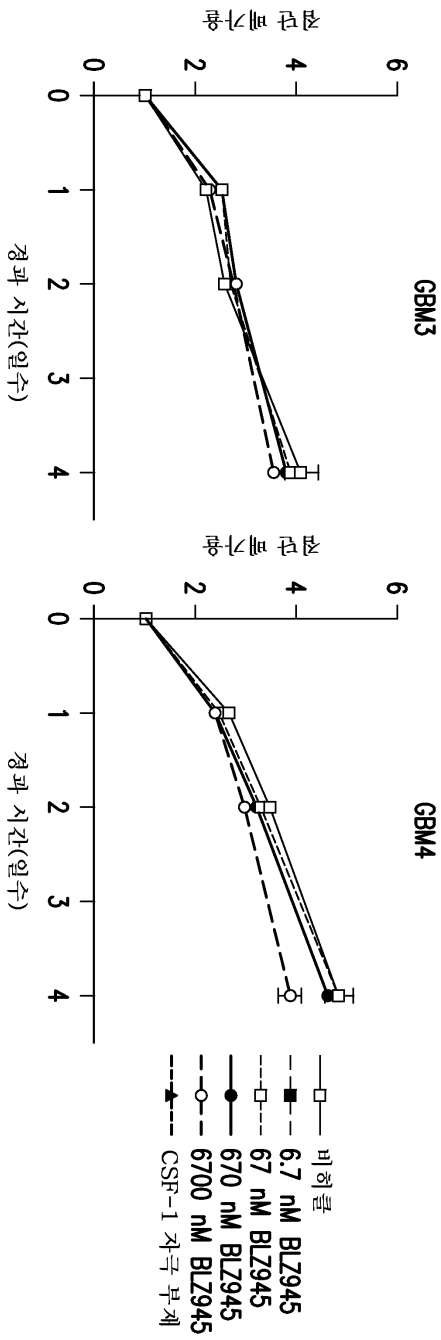
도면3c



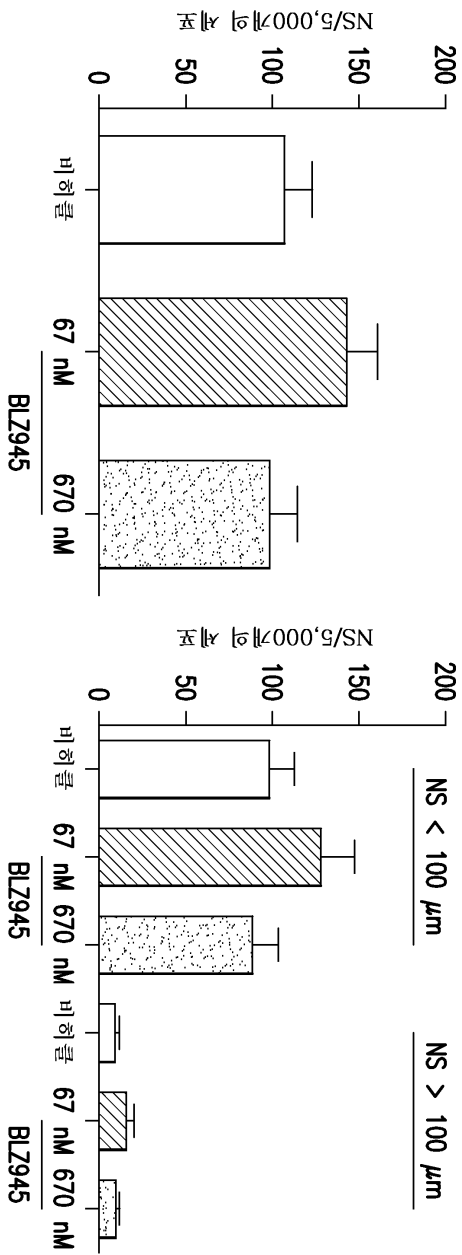
도면3d



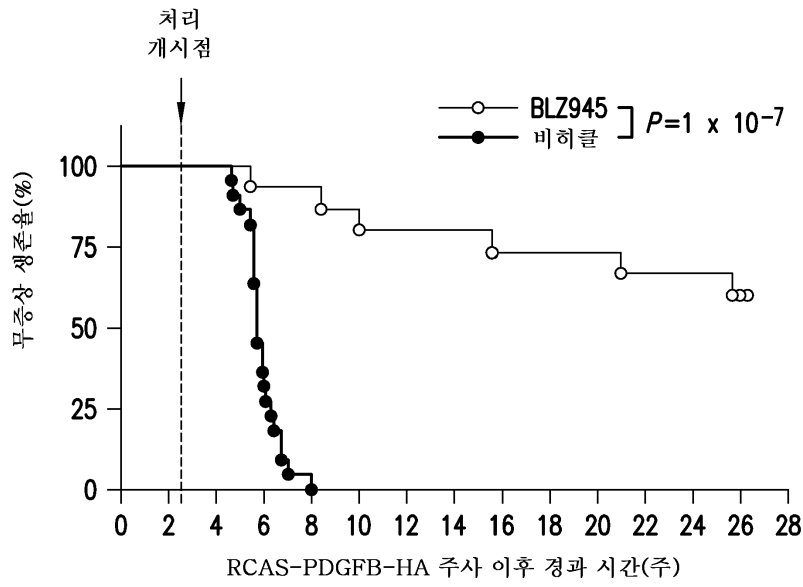
도면3e



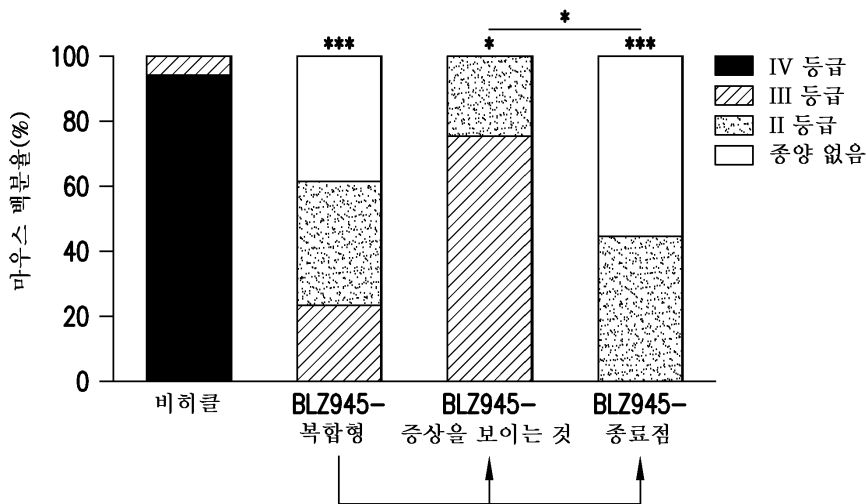
도면3f



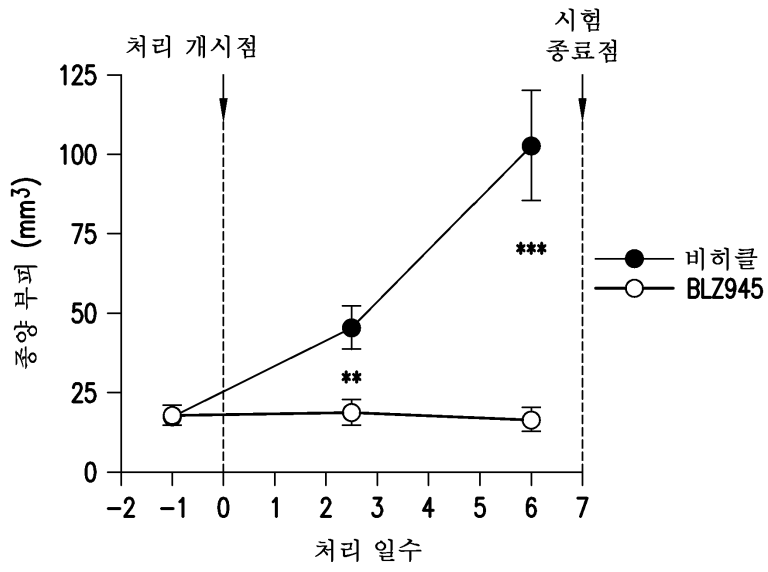
도면4a



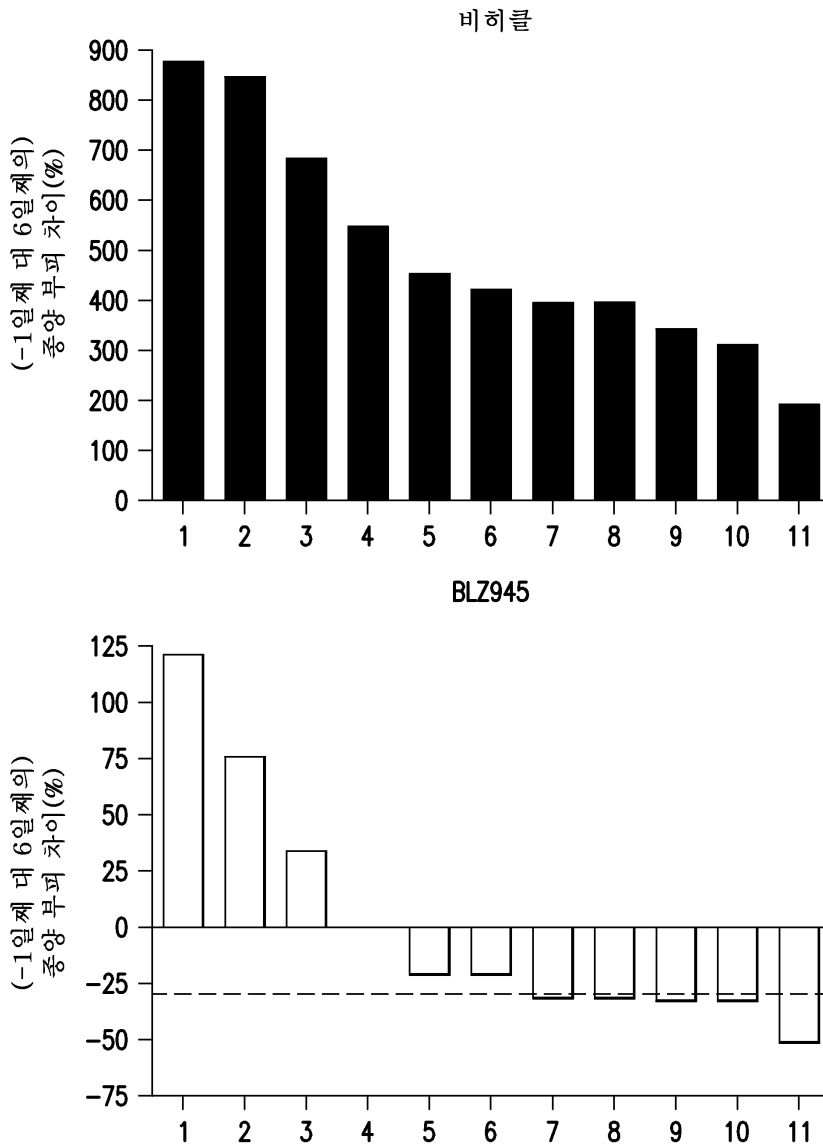
도면4b



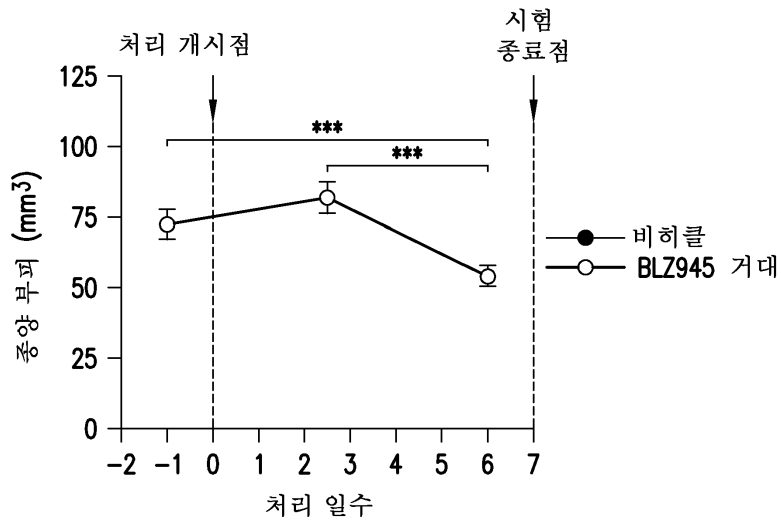
도면5a



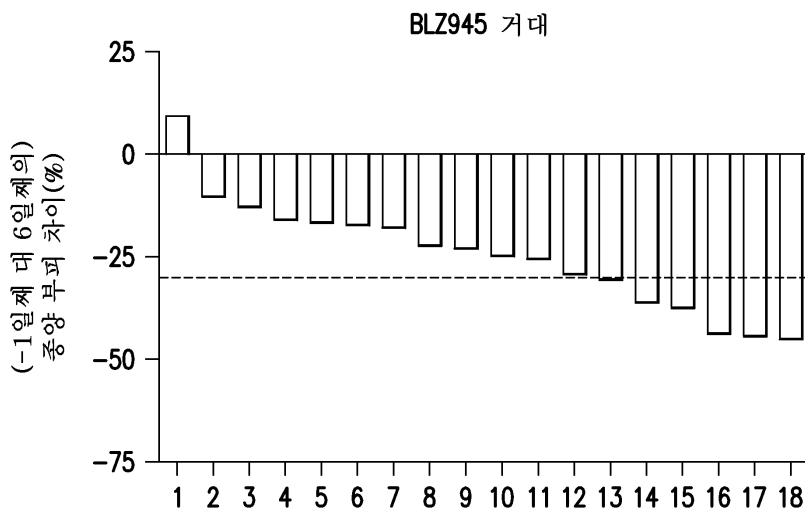
도면5b



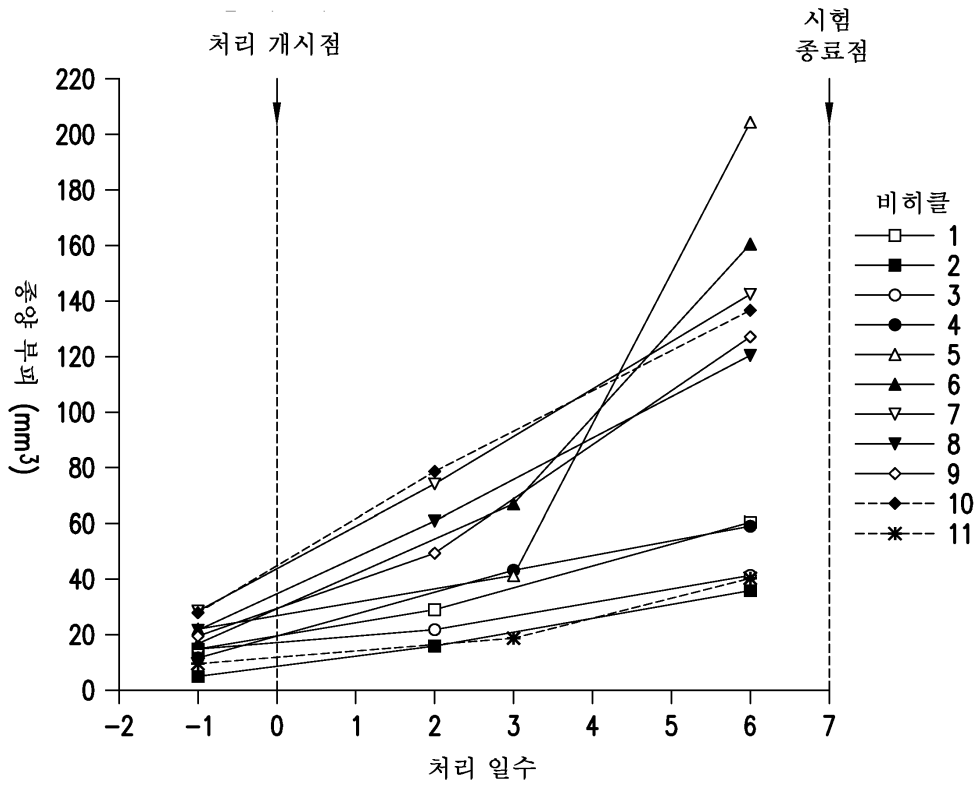
도면5c



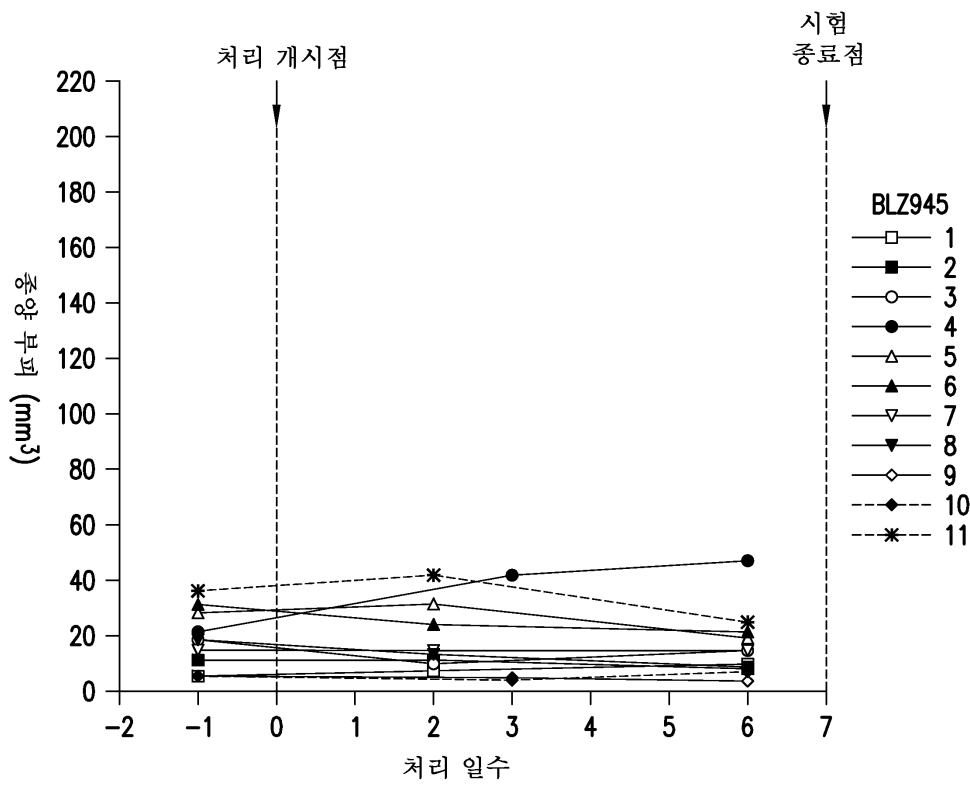
도면5d



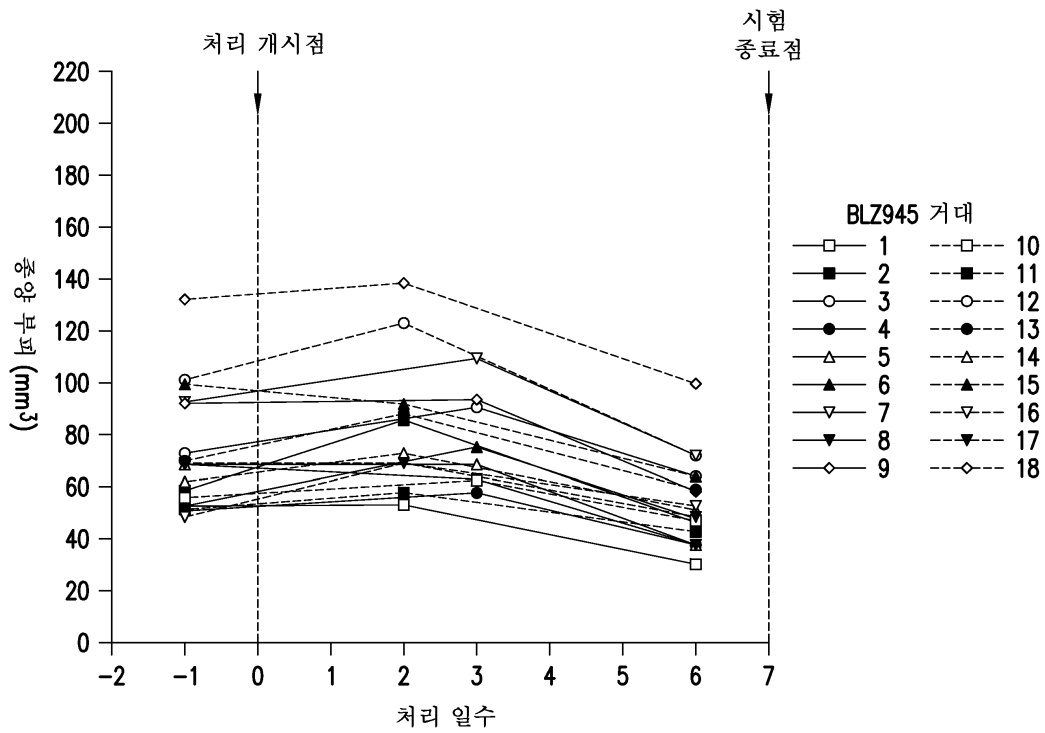
도면5e



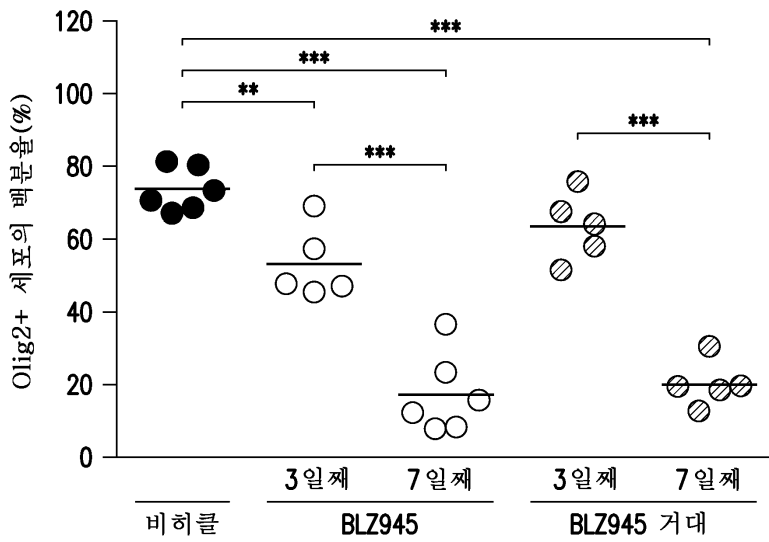
도면5f



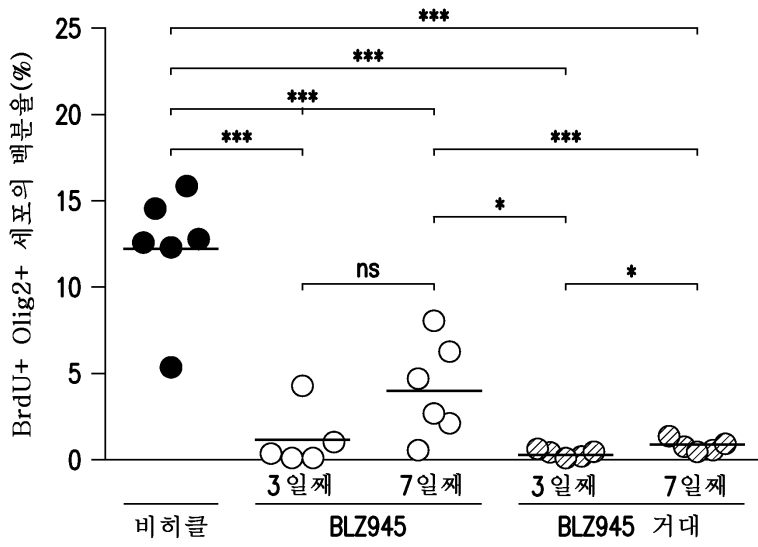
도면5g



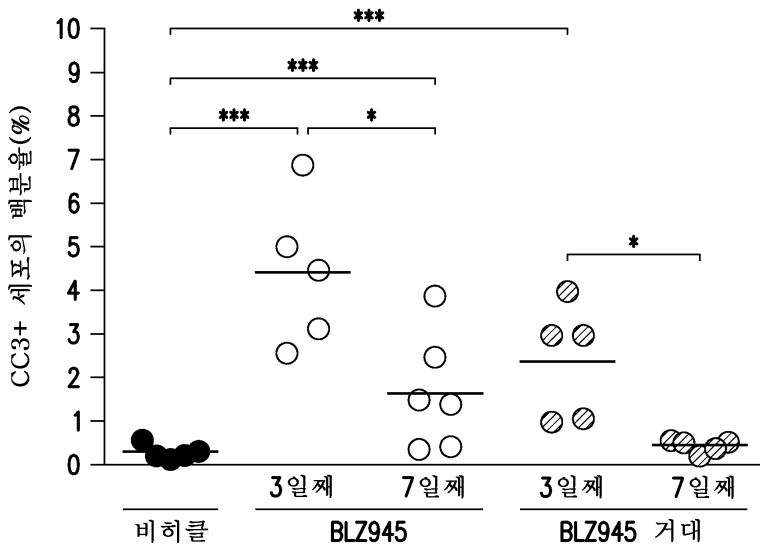
도면6a



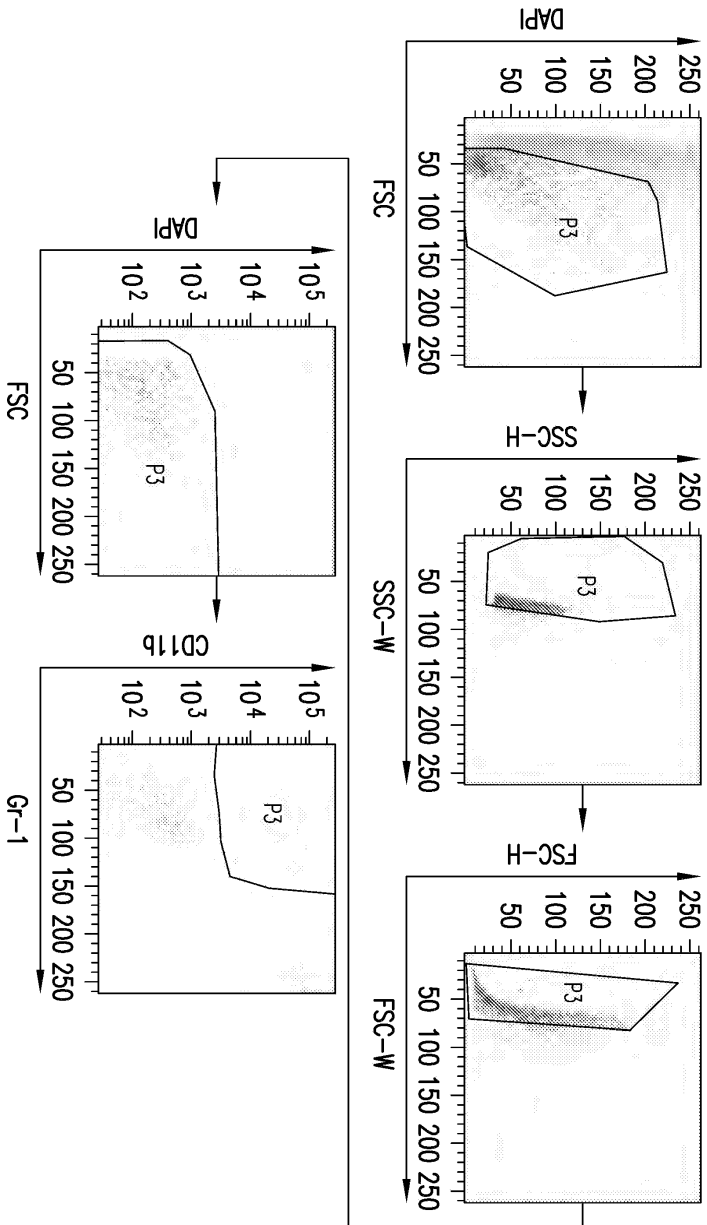
도면6b



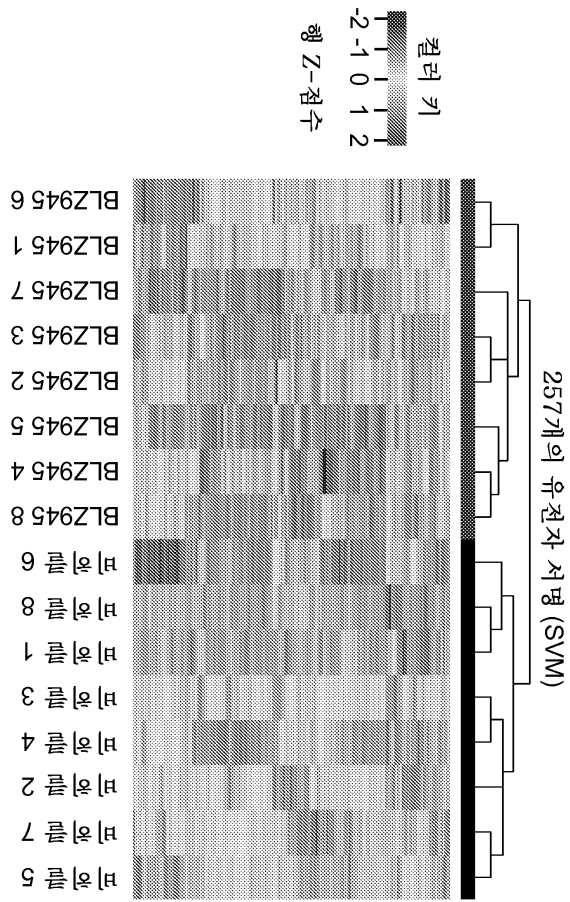
도면6c



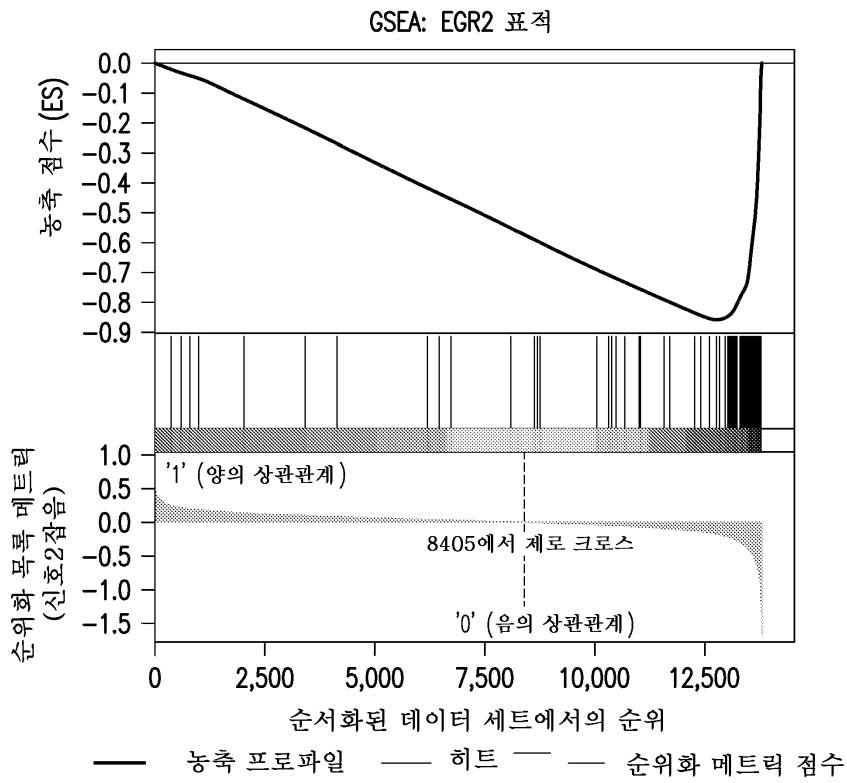
도면7a



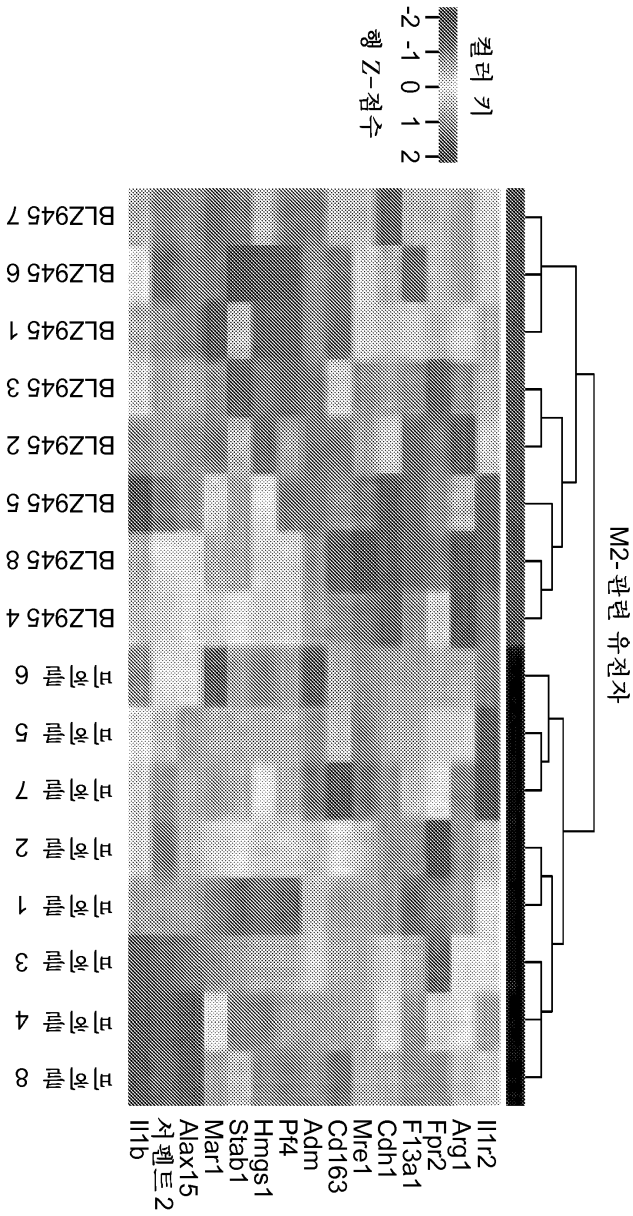
도면7b



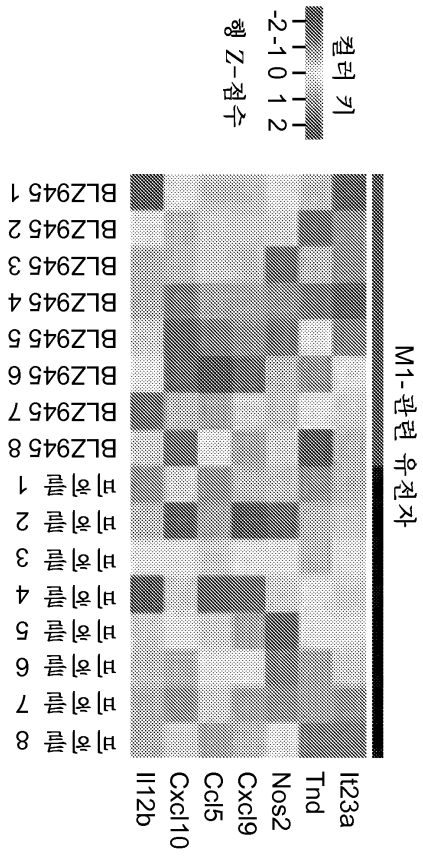
도면7c



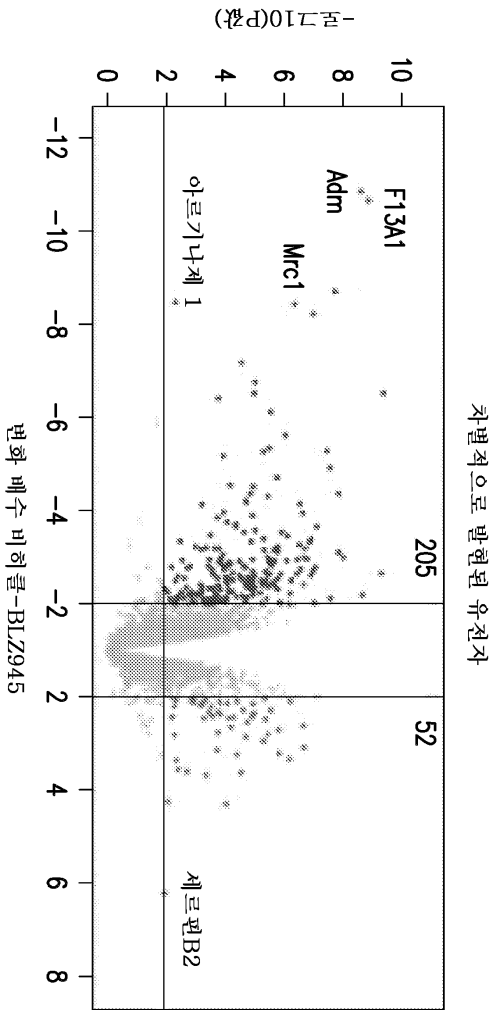
p2면도



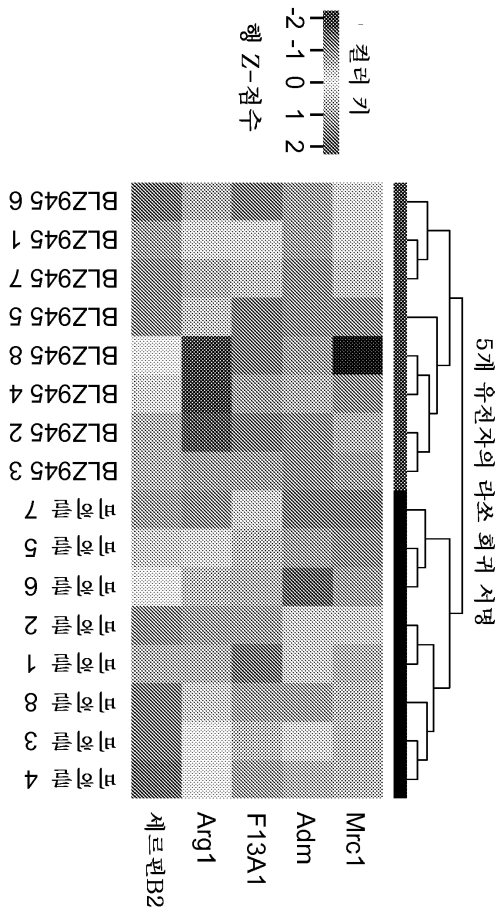
도면7e



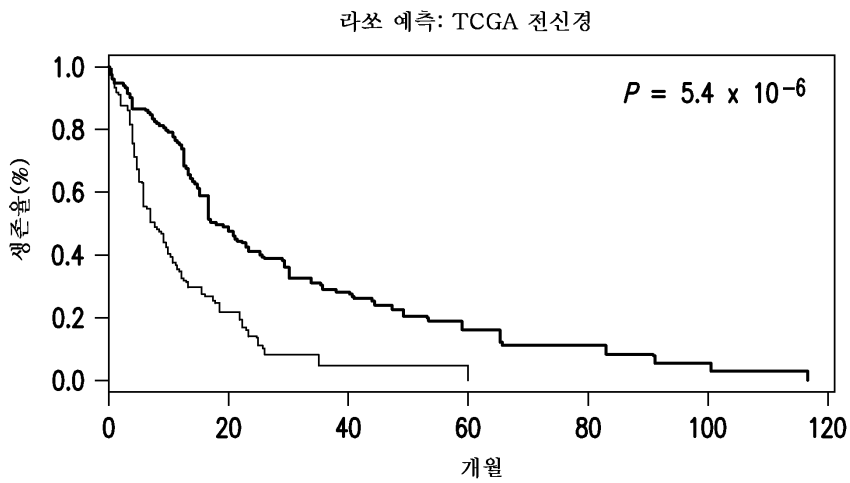
도면8a



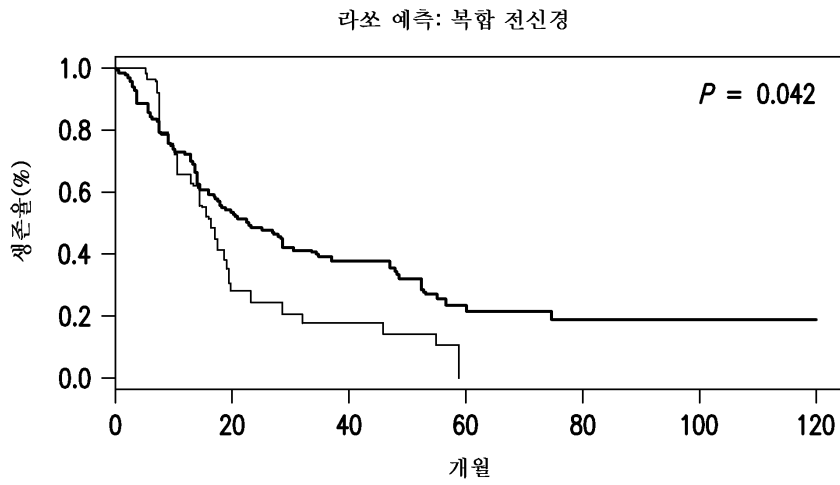
도면8b



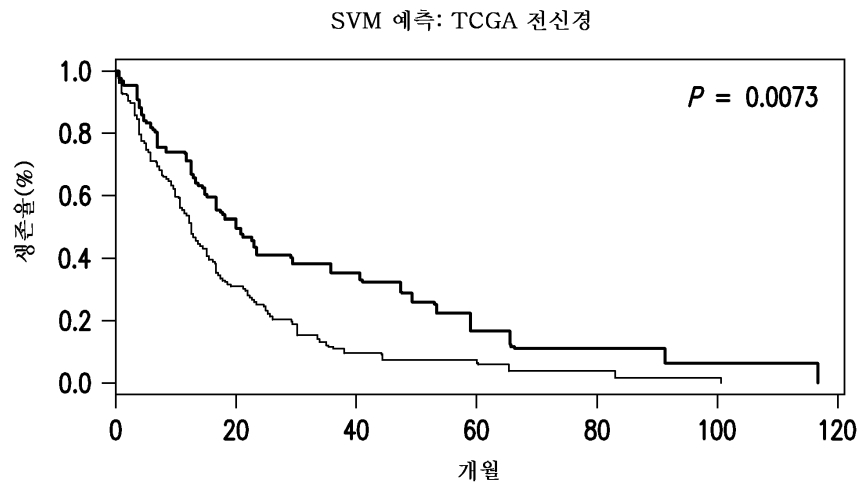
도면8c



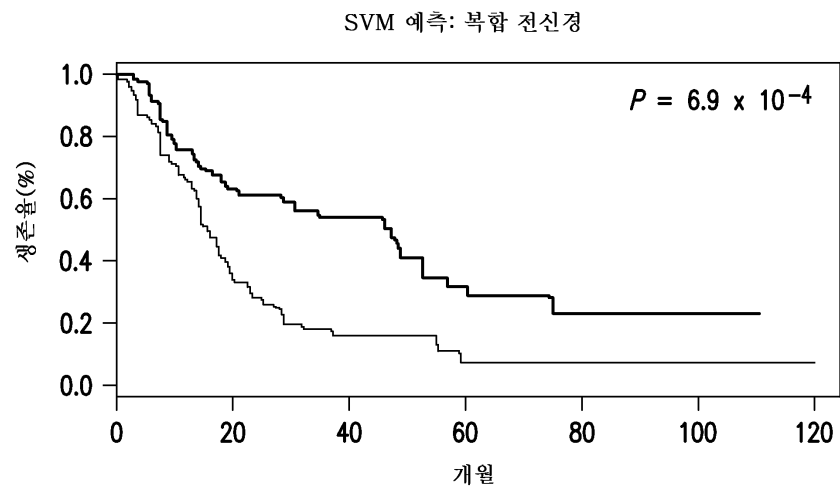
도면8d



도면8e



도면8f



도면8g

