(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0109696
(43) 공개일자 2023년07월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*C12Q 1/6886* (2018.01)
(52) CPC특허분류
*C12Q 1/6886* (2022.01)
*C12Q 2600/106* (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7020325
(22) 출원일자(국제) 2021년11월18일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년06월16일
(86) 국제출원번호 PCT/US2021/072496
(87) 국제공개번호 WO 2022/109588
국제공개일자 2022년05월27일
(30) 우선권주장
63/115,580 2020년11월18일 미국(US)
*(뒷면에 계속)*

(71) 출원인
**랜턴 파마 인코포레이티드**
미국, 텍사스 75201, 댈러스, 매키니 애비뉴 1920
(72) 발명자
**바티아, 키쇼르**
미국, 텍사스 75201, 댈러스 7층, 매키니 애비뉴 1920
**쿨카니, 아딧야**
미국, 텍사스 75201, 댈러스 7층, 매키니 애비뉴 1920
(74) 대리인
**특허법인씨엔에스**

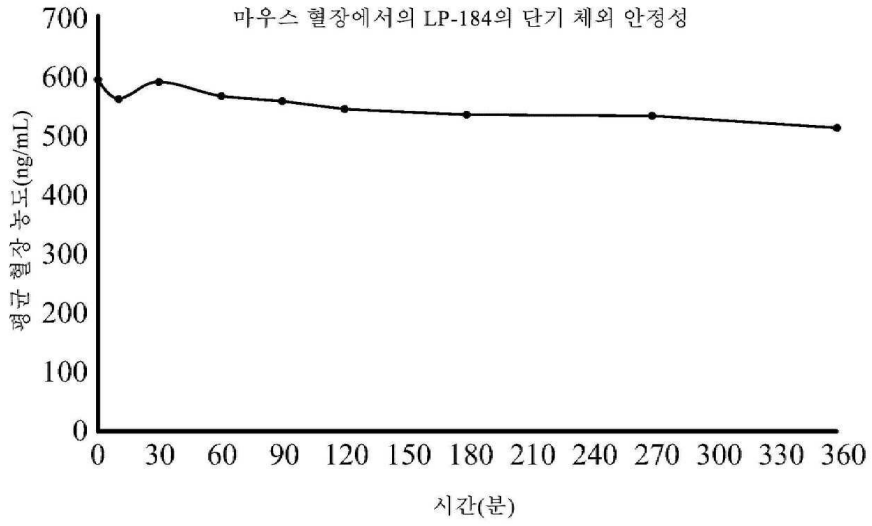
전체 청구항 수 : 총 43 항

(54) 발명의 명칭 **암 약물 민감도 결정 마커**

## (57) 요 약

본 출원은 항암제가 투여될 암 환자의 항암제(예를 들어, 일루딘/일루딘 유사체)에 대한 민감도를 결정하는 데 사용하기 위한 마커에 관한 것으로, 이러한 마커는 환자의 암이 항암제에 대한 치료 반응을 갖는지 여부를 결정하고 마커의 도포를 결정할 수 있다.

*대 표 도* - 도1a



(52) CPC특허분류
*C12Q 2600/136* (2013.01)
*C12Q 2600/158* (2013.01)

(30) 우선권주장
63/127,102 2020년12월17일 미국(US)
63/223,540 2021년07월19일 미국(US)

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

항암제에 대한 암의 민감도를 결정하기 위한 방법으로서, 본 방법은 하나 이상의 바이오마커의 발현 수준, DNA 복구와 관련된 하나 이상의 유전자의 발현 수준, 이들의 하나 이상의 전사 수준, 또는 이들의 임의의 조합을 결정하는 단계를 포함하되, 항암제는 일루딘 또는 일루딘 유사체를 포함하는, 방법.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 일루딘 유사체는 하이드록시우레아메틸아실풀벤인, 방법.

### 청구항 3

제1항에 있어서, 일루딘 유사체는 이로풀벤인, 방법.

### 청구항 4

제1항에 있어서, 표준 샘플 또는 대조군 샘플과 비교하여 감소된 발현 또는 전사 수준이 항암제에 대한 암의 민감도를 나타내는, 방법.

### 청구항 5

제1항에 있어서, 암은 고형 종양을 포함하는, 방법.

### 청구항 6

제5항에 있어서, 고형 종양은 유방, 중추 신경계, 결장, 피부, 폐, 난소, 전립선 또는 신장의 종양인, 방법.

### 청구항 7

제1항에 있어서, 암은 유방암, 중추 신경계 암, 결장암, 흑색종, 폐암, 난소암, 전립선암, 또는 신장암인, 방법.

### 청구항 8

제1항에 있어서, DNA 복구와 관련된 하나 이상의 유전자는 DNA 손상 복구 유전자(DDRG)인, 방법.

### 청구항 9

제1항에 있어서, DNA 복구와 관련된 하나 이상의 유전자는 뉴클레오티드 절제 복구(NER) 유전자인, 방법.

### 청구항 10

제1항에 있어서, DNA 복구와 관련된 하나 이상의 유전자는 상동 재조합(HR) 유전자인, 방법.

### 청구항 11

제1항에 있어서, DNA 복구와 관련된 하나 이상의 유전자는 BRCA1, BRCA2, ATM, ATR, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5, ERCC6, FANCD2, RAD51, 또는 PALB2를 포함하는, 방법.

### 청구항 12

제1항에 있어서, 하나 이상의 바이오마커는 RPA1, FANCE, FANCL, ERCC8/CSA, BRIP1, FANCF, MRE11A, BLM, ERCC3/XPB, FANCM, FANCB, FANCE, CHEK1, FANCI, ATM, ERCC4/XPG, ERCC6/CSB, CHEK2, ERCC2/XPD, 또는 ERCC3 유전자의 발현을 포함하는, 방법.

### 청구항 13

제1항에 있어서, 하나 이상의 바이오마커는 RPA1, FANCE, FANCL, BRIP1, FANCF, MRE11A, BLM, CHEK1, CHEK2, 또는 ATM의 발현을 포함하는, 방법.

**청구항 14**

제1항에 있어서, 하나 이상의 바이오마커는 PTGRI 또는 SDC4의 발현을 포함하는, 방법.

**청구항 15**

제1항에 있어서, 전사 수준이 DNA 복구와 관련된 하나 이상의 유전자로부터 전사된 mRNA의 양을 측정함으로써 결정되는, 방법.

**청구항 16**

치료를 필요로 하는 대상체의 암을 치료하는 데 사용하기 위한 항암제를 스크리닝 하는 방법으로서, 본 방법은 항암제에 노출된 후의 대상체로부터의 샘플에서 하나 이상의 바이오마커의 발현 수준, DNA 복구와 관련된 하나 이상의 유전자의 발현 수준, 이들의 하나 이상의 전사 수준, 또는 이들의 임의의 조합에서의 변화를 결정하는 단계를 포함하되, 항암제는 일루딘 또는 일루딘 유사체를 포함하는, 방법.

**청구항 17**

제16항에 있어서, 발현 또는 전사 수준의 감소가 항암제에 대한 민감도를 나타내는, 방법.

**청구항 18**

제16항에 있어서, 항암제는 하이드록시우레아메틸아실풀벤인, 방법.

**청구항 19**

제16항에 있어서, 항암제는 이로풀벤인, 방법.

**청구항 20**

제16항에 있어서, 암은 고형 종양을 포함하는, 방법.

**청구항 21**

제20항에 있어서, 고형 종양은 유방, 중추 신경계, 결장, 피부, 폐, 난소, 전립선 또는 신장의 종양인, 방법.

**청구항 22**

제16항에 있어서, DNA 복구와 관련된 하나 이상의 유전자는 DNA 손상 복구 유전자(DDRG)인, 방법.

**청구항 23**

제16항에 있어서, DNA 복구와 관련된 하나 이상의 유전자는 뉴클레오티드 절제 복구(NER) 유전자인, 방법.

**청구항 24**

제16항에 있어서, DNA 복구와 관련된 하나 이상의 유전자는 상동 재조합(HR) 유전자인, 방법.

**청구항 25**

제16항에 있어서, DNA 복구와 관련된 하나 이상의 유전자는 BRCA1, BRCA2, ATM, ATR, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5, ERCC6, FANCD2, RAD51, 또는 PALB2를 포함하는, 방법.

**청구항 26**

제16항에 있어서, 하나 이상의 바이오마커는 RPA1, FANCE, FANCL, ERCC8/CSA, BRIP1, FANCF, MRE11A, BLM, ERCC3/XPB, FANCM, FANCB, FANCE, CHEK1, FANCI, ATM, ERCC4/XPG, ERCC6/CSB, CHEK2, ERCC2/XPD, 또는 ERCC3 유전자의 발현을 포함하는, 방법.

**청구항 27**

제15항에 있어서, 하나 이상의 바이오마커는 RPA1, FANCE, FANCL, BRIP1, FANCF, MRE11A, BLM, CHEK1, CHEK2, 또는 ATM의 발현을 포함하는, 방법.

**청구항 28**

제15항에 있어서, 하나 이상의 바이오마커는 PTGRI 또는 SDC4의 발현을 포함하는, 방법.

**청구항 29**

치료를 필요로 하는 대상체의 암을 치료하기 위한 방법으로서, 본 방법은 유효량의 항암제를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하되, 대상체는 바이오마커의 감소된 발현 수준, DNA 복구와 관련된 하나 이상의 유전자의 감소된 발현, 이들의 하나 이상의 감소된 전사 수준, 또는 이들의 임의의 조합을 갖되, 항암제는 일루딘 또는 일루딘 유사체를 포함하는, 방법.

**청구항 30**

제29항에 있어서, 감소된 발현 수준 또는 전사 수준이 표준 샘플 또는 대조군 샘플과 비교되는, 방법.

**청구항 31**

제29항에 있어서, 항암제는 일루딘 또는 일루딘 유사체를 포함하는, 방법.

**청구항 32**

제29항에 있어서, 암은 고형 종양을 포함하는, 방법.

**청구항 33**

제32항에 있어서, 고형 종양은 유방, 중추 신경계, 결장, 피부, 폐, 난소, 전립선 또는 신장의 종양인, 방법.

**청구항 34**

제29항에 있어서, 암은 유방암, 중추 신경계 암, 결장암, 흑색종, 폐암, 난소암, 전립선암, 또는 신장암인, 방법.

**청구항 35**

제29항에 있어서, DNA 복구와 관련된 하나 이상의 유전자는 DNA 손상 복구 유전자(DDRG)인, 방법.

**청구항 36**

제29항에 있어서, DNA 복구와 관련된 하나 이상의 유전자는 뉴클레오티드 절제 복구(NER) 유전자인, 방법.

**청구항 37**

제29항에 있어서, DNA 복구와 관련된 하나 이상의 유전자는 상동 재조합(HR) 유전자인, 방법.

**청구항 38**

제29항에 있어서, DNA 복구와 관련된 하나 이상의 유전자는 BRCA1, BRCA2, ATM, ATR, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5, ERCC6, FANCD2, RAD51, 또는 PALB2를 포함하는, 방법.

**청구항 39**

제29항에 있어서, 하나 이상의 바이오마커는 RPA1, FANCE, FANCL, ERCC8/CSA, BRIP1, FANCF, MRE11A, BLM, ERCC3/XPB, FANCM, FANCB, FANCE, CHEK1, FANCI, ATM, ERCC4/XPG, ERCC6/CSB, CHEK2, ERCC2/XPD, 또는 ERCC3 유전자의 발현을 포함하는, 방법.

**청구항 40**

제29항에 있어서, 하나 이상의 바이오마커는 RPA1, FANCE, FANCL, BRIP1, FANCF, MRE11A, BLM, CHEK1, CHEK2, 또는 ATM의 발현을 포함하는, 방법.

**청구항 41**

제29항에 있어서, 하나 이상의 바이오마커는 PTGR1 또는 SDC4의 발현을 포함하는, 방법.

**청구항 42**

제29항에 있어서, 전사 수준이 DNA 복구와 관련된 하나 이상의 유전자로부터 전사된 mRNA의 양을 측정함으로써 결정되는, 방법.

**청구항 43**

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 방법에 따라 항암제에 대한 시편의 민감도를 결정하는 데 사용하기 위한 키트로서, 키트는 하나 이상의 시약, 표준물, 및 이의 사용 설명서를 포함하고, 표준물은 하나 이상의 바이오마커 또는 발현 생성물 또는 전사 생성물을 포함하여, 항암제에 대한 시편의 민감도를 스크리닝하기 위한 임계 수준, 또는 표적 수준을 제공하되, 항암제는 일루딘 또는 일루딘 유사체를 포함하는, 키트.

## *발명의 설명*

### *기 술 분 야*

[0001] 교차 참조

[0002] 본 출원은 2020년 11월 18일자로 출원된 미국 가출원 번호 제63/115,580호, 2020년 12월 17일자로 출원된 미국 가출원 번호 제63/127,102호, 및 2021년 7월 19일자로 출원된 미국 가출원 번호 제63/223,540호의 이익을 주장하며, 이들 출원은 본원에 참조로서 통합된다.

[0003] 참조에 의한 통합

[0004] 본 명세서에서 언급된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 각각의 개별 간행물, 특허, 또는 특허 출원이 참조로서 구체적이고 개별적으로 통합되는 것으로 표시되는 것과 동일한 정도로 본원에 참조로 통합된다.

### *배 경 기 술*

[0005] 예를 들어 일루딘-기반 치료를 이용한 이들 스크리닝 및 치료와 관련하여 다수의 중요한 지식 격차가 존재한다. 진단 시, 환자를 반응군으로 최적으로 계층화하는 데에 필요한, 유전자 프로파일을 포함하는 환자 특성에 대한 지식이 불충분하다. 또한 이러한 암으로 발전하거나 사망하는 위험 요소에 대한 지식이 부족하고 임상 실습을 위한 증거의 효과적인 구현이 부족하다. 이러한 지식의 부족은 어느 환자가 특정 치료에 대해 최상의 결과를 얻을 것인지를 예측하는 것이 최적이 아님을 의미한다.

[0006] 따라서, 항암제에 대한 환자의 민감도를 평가하고 결정하기 위한 개선된 방법이 필요하다.

### *발명의 내용*

[0007] 항암제에 대한 암의 민감도를 결정하기 위한 방법이 본원에서 제공되며, 본 방법은 하나 이상의 바이오마커의 발현 수준, DNA 복구와 관련된 하나 이상의 유전자의 발현 수준, 이들의 하나 이상의 전사 수준, 또는 이들의 임의의 조합을 결정하는 단계를 포함한다. 표준 샘플 또는 대조군 샘플과 비교하여 감소된 발현 또는 전사 수준이 항암제에 대한 암의 민감도를 나타내는 방법이 본원에 추가로 제공된다. 항암제는 일루딘 또는 일루딘 유사체를 포함하는 방법이 본원에 추가로 제공된다. 암은 고형 종양을 포함하는 방법이 본원에 추가로 제공된다. 고형 종양은 유방, 중추 신경계, 결장, 피부, 폐, 난소, 전립선, 또는 신장의 종양인 방법이 본원에 추가로 제공된다. 암은 유방암, 중추 신경계 암, 결장암, 흑색종, 폐암, 난소암, 전립선암, 또는 신장암인 방법이 본원에 추가로 제공된다. DNA 복구와 관련된 하나 이상의 유전자는 DNA 손상 복구 유전자(DDRG: DNA Damage Repair Gene)인 방법이 본원에 추가로 제공된다. DNA 복구와 관련된 하나 이상의 유전자는 뉴클레오티드 절제 복구(NER: Nucleotide Excision Repair) 유전자인 방법이 본원에 추가로 제공된다. DNA 복구와 관련된 하나 이상의 유전자는 상동 재조합(HR) 유전자인 방법이 본원에 추가로 제공된다. DNA 복구와 관련된 하나 이상의 유전

자는 BRCA1, BRCA2, ATM, ATR, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5, ERCC6, FANCD2, RAD51, 또는 PALB2를 포함하는 방법이 본원에 추가로 제공된다. 하나 이상의 바이오마커는 RPA1, FANCE, FANCL, ERCC8/CSA, BRIP1, FANCF, MRE11A, BLM, ERCC3/XPB, FANCM, FANCB, FANCE, CHEK1, FANCI, ATM, ERCC4/XPG, ERCC6/CSB, CHEK2, ERCC2/XPD, 또는 ERCC3 유전자의 발현을 포함하는 방법이 본원에 추가로 제공된다. 하나 이상의 바이오마커는 RPA1, FANCE, FANCL, BRIP1, FANCF, MRE11A, BLM, CHEK1, CHEK2, 또는 ATM의 발현을 포함하는 방법이 본원에 추가로 제공된다. 하나 이상의 바이오마커는 PTGRI 또는 SDC4의 발현을 포함하는 방법이 본원에 추가로 제공된다. 전사 수준이 DNA 복구와 관련된 하나 이상의 유전자로부터 전사된 mRNA의 양을 측정함으로써 결정되는 방법이 본원에 추가로 제공된다.

[0008] 치료를 필요로 하는 대상체의 암을 치료하는 데 사용하기 위한 항암제를 스크리닝 하는 방법이 본원에서 제공되며, 본 방법은 항암제에 노출된 후의 대상체로부터의 샘플에서 하나 이상의 바이오마커의 발현 수준, DNA 복구와 관련된 하나 이상의 유전자의 발현 수준, 이들의 하나 이상의 전사 수준, 또는 이들의 임의의 조합에서의 변화를 결정하는 단계를 포함한다. 발현 또는 전사 수준의 감소가 항암제에 대한 민감도를 나타내는 방법이 본원에 추가로 제공된다. 항암제는 일루딘 또는 일루딘 유사체를 포함하는 방법이 본원에 추가로 제공된다. 암은 고형 종양을 포함하는 방법이 본원에 추가로 제공된다. 고형 종양은 유방, 중추 신경계, 결장, 피부, 폐, 난소, 전립선, 또는 신장의 종양인 방법이 본원에 추가로 제공된다. 암은 유방암, 중추 신경계 암, 결장암, 흑색종, 폐암, 난소암, 전립선암, 또는 신장암인 방법이 본원에 추가로 제공된다. DNA 복구와 관련된 하나 이상의 유전자는 DNA 손상 복구 유전자(DDRG)인 방법이 본원에 추가로 제공된다. DNA 복구와 관련된 하나 이상의 유전자는 뉴클레오티드 절제 복구(NER) 유전자인 방법이 본원에 추가로 제공된다. DNA 복구와 관련된 하나 이상의 유전자는 상동 재조합(HR) 유전자인 방법이 본원에 추가로 제공된다. DNA 복구와 관련된 하나 이상의 유전자는 BRCA1, BRCA2, ATM, ATR, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5, ERCC6, FANCD2, RAD51, 또는 PALB2를 포함하는 방법이 본원에 추가로 제공된다. 하나 이상의 바이오마커는 RPA1, FANCE, FANCL, ERCC8/CSA, BRIP1, FANCF, MRE11A, BLM, ERCC3/XPB, FANCM, FANCB, FANCE, CHEK1, FANCI, ATM, ERCC4/XPG, ERCC6/CSB, CHEK2, ERCC2/XPD, 또는 ERCC3 유전자의 발현을 포함하는 방법이 본원에 추가로 제공된다. 하나 이상의 바이오마커는 RPA1, FANCE, FANCL, BRIP1, FANCF, MRE11 A, BLM, CHEK1, CHEK2, 또는 ATM의 발현을 포함하는 방법이 본원에 추가로 제공된다. 하나 이상의 바이오마커는 PTGRI 또는 SDC4의 발현을 포함하는 방법이 본원에 추가로 제공된다. 전사 수준이 DNA 복구와 관련된 하나 이상의 유전자로부터 전사된 mRNA의 양을 측정함으로써 결정되는 방법이 본원에 추가로 제공된다.

[0009] 치료를 필요로 하는 대상체의 암을 치료하기 위한 방법이 본원에서 제공되며, 본 방법은 유효량의 항암제를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하되, 대상체는 바이오마커의 감소된 발현 수준, DNA 복구와 관련된 하나 이상의 유전자의 감소된 발현, 이들의 하나 이상의 감소된 전사 수준, 또는 이들의 임의의 조합을 갖는다. 감소된 발현 수준 또는 전사 수준이 표준 샘플 또는 대조군 샘플과 비교되는 방법이 본원에 추가로 제공된다. 항암제는 일루딘 또는 일루딘 유사체를 포함하는 방법이 본원에 추가로 제공된다. 암은 고형 종양을 포함하는 방법이 본원에 추가로 제공된다. 고형 종양은 유방, 중추 신경계, 결장, 피부, 폐, 난소, 전립선, 또는 신장의 종양인 방법이 본원에 추가로 제공된다. 암은 유방암, 중추 신경계 암, 결장암, 흑색종, 폐암, 난소암, 전립선암, 또는 신장암인 방법이 본원에 추가로 제공된다. DNA 복구와 관련된 하나 이상의 유전자는 DNA 손상 복구 유전자(DDRG)인 방법이 본원에 추가로 제공된다. DNA 복구와 관련된 하나 이상의 유전자는 뉴클레오티드 절제 복구(NER) 유전자인 방법이 본원에 추가로 제공된다. DNA 복구와 관련된 하나 이상의 유전자는 상동 재조합(HR) 유전자인 방법이 본원에 추가로 제공된다. DNA 복구와 관련된 하나 이상의 유전자는 BRCA1, BRCA2, ATM, ATR, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5, ERCC6, FANCD2, RAD51, 또는 PALB2를 포함하는 방법이 본원에 추가로 제공된다. 하나 이상의 바이오마커는 RPA1, FANCE, FANCL, ERCC8/CSA, BRIP1, FANCF, MRE11A, BLM, ERCC3/XPB, FANCM, FANCB, FANCE, CHEK1, FANCI, ATM, ERCC4/XPG, ERCC6/CSB, CHEK2, ERCC2/XPD, 또는 ERCC3 유전자의 발현을 포함하는 방법이 본원에 추가로 제공된다. 하나 이상의 바이오마커는 RPA1, FANCE, FANCL, BRIP1, FANCF, MRE11 A, BLM, CHEK1, CHEK2, 또는 ATM의 발현을 포함하는 방법이 본원에 추가로 제공된다. 하나 이상의 바이오마커는 PTGRI 또는 SDC4의 발현을 포함하는 방법이 본원에 추가로 제공된다. 전사 수준이 DNA 복구와 관련된 하나 이상의 유전자로부터 전사된 mRNA의 양을 측정함으로써 결정되는 방법이 본원에 추가로 제공된다.

[0010] 본원에 기술된 임의의 방법에 따라 항암제에 대한 시편의 민감도를 결정하는 데 사용하기 위한 키트가 본원에서 제공되며, 키트는 하나 이상의 시약, 표준물, 및 이의 사용 설명서를 포함하고, 표준물은 하나 이상의 바이오마커 또는 발현 생성물 또는 전사 생성물을 포함하여, 항암제에 대한 시편의 민감도를 스크리닝하기 위한 임계 수준, 또는 표적 수준을 제공한다.

## *도면의 간단한 설명*

[0011] 본 발명의 새로운 특징은 첨부된 청구범위에서 상세하게 제시된다. 본 발명의 원리가 사용되는 예시적인 구현예를 제시하는 다음의 상세한 설명을 참조하여 본 발명의 특징 및 이점에 대한 더 나은 이해가 얻어질 것이며, 첨부 도면은 다음과 같다:

**도 1a**는 시간 경과에 따른 혈장에서의 LP-184의 *시험관내* 농도의 선 그래프이다.

**도 1b**는LP-184의 *생체내* 약동학의 선 그래프이다.

**도 2**는 다양한 암 세포주에서 LP-184 IC50의 로그$_{10}$을 보여주는 막대 그래프이다.

**도 3**은 ERCC4 고갈 전후의 췌장 세포 암탉 Panc03.27의 LP-184 IC50를 보여주는 막대 그래프이다.

**도 4a 및 도 4b**는 LP-184 및 올라파립으로 치료 후, BRCA2 고갈 유무에 따른 PC3M 세포의 민감도를 보여주는 선 그래프이다.

**도 5a**는 살아있는 세포 또는 죽은 세포를 나타내도록 염색된 LuCaP 96 오가노이드의 이미지로, LP-184로 치료한 후의 용량-의존적 세포사를 보여준다.

**도 5b**는 평균 오가노이드 수/필드 대 용량 LP-184를 도시하는 선 그래프이다.

**도 5c**는 죽은 세포/필드 대 용량 LP-184를 보여주는 막대 차트이다.

**도 6**은 LP-184 민감도의 예측자로서 NER 유전자의 발현의 t-SNE 차트이다.

**도 7**은 NER 유전자인 ERCC3 및 ERCC6의 높은 발현 또는 낮은 발현을 갖는 세포에서 LP-184의 예측된 IC50 값의 산점도이다.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0012] 본 출원의 일 양태는 항암제 민감도 결정 마커를 포함하며, 이는 바이오마커 또는 DNA 손상 복구 유전자 또는 DDRG 전사 수준과의 음의 상관관계를 포함한다(DDRG 유전자의 발현이 감소된 종양임). DDRG 전사체 수준은 일루딘-기반 치료에 대한 민감도와 음의 상관관계가 있거나, 일루딘-기반 치료에 대한 진정한 반응자와 상관관계가 있었다. 즉, DDRG의 돌연변이를 갖는 고형 종양은 일루딘-기반 치료에 더 민감하다. 이러한 마커를 단독으로 또는 다른 것과 함께 사용하는 것은, 환자에게 정밀 의학-기반 요법을 가능하게 하는 바이오마커-기반 스크리닝 시험에 의해 암 (특히, 고형 종양)의 치료에서의 간극을 개선할 수 있다.

[0013] 또 다른 양태는 치료를 필요로 하는 대상체의 암을 치료하는 방법을 포함한다. 본 방법은 유효량의 일루딘 또는 일루딘 유사체를 대상체에게 투여하는 단계로서, 대상체는 DNA 복구의 결함 또는 NER 또는 HR 유전자 경로의 결함을 갖는, 단계를 포함한다. 일 구현예는 암을 앓고 있는 대상체의 일루딘-기반 항암제에 대한 민감도를 결정하기 위한 방법을 포함한다. 본 방법은 대상체로부터의 시편에서 다양한 DDRG 유전자의 수준 또는 존재 또는 전사체 수준을 측정하는 단계를 포함한다. 이들 유전자의 수준 또는 부재는 일루딘-기반 항암제에 대한 대상체의 민감도를 나타낸다. 특정 구현예에서, 복수의 바이오마커 민감도의 발현 수준은 복수의 민감도 바이오마커를 암호화하는 유전자로부터 전사된 mRNA의 수준을 검출함으로써 결정된다.

[0014] 또 다른 구현예에서, NER 및/또는 HR 유전자 발현을 사용하여, 암을 앓고 있는 대상체의 일루딘-기반 항암제에 대한 민감도를 결정하기 위한 방법을 포함한다. 즉, 일례에서, 다음의 DNA 복구 경로-NER(뉴클레오티드 절제 복구) 및 HR(상동 재조합)-에서 유전적 교번을 보유한 특정 췌장 종양은 LP-184에 대해 2배 증가된 민감도를 가졌다. DNA 복구 경로 돌연변이를 갖는 다른 암은 BRCA1, BRCA2, ATM, ATR, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5, ERCC6, FANCD2, RAD51 및 PALB2와 같은 유전자에서 돌연변이 또는 결함을 포함한다.

[0015] 또 다른 구현예에서, 다음의 유전자 마커 중 하나 이상, 즉 이들 마커의 감소된 발현 또는 전사는 일루딘 또는 LP-184에 대한 더 많은 민감도를 나타내었다. 이들 마커는 **표 1**의 다음 유전자를 포함한다.

[0016] [표 1]

| DDRG |
|---|
| ATM |
| BLM |
| BRIP1 |
| CHEK1 |
| CHEK2 |
| ERCC2/XPD |
| ERCC3 |
| ERCC3/XPB |
| ERCC5/XPG |
| ERCC6/CSB |
| ERCC8/CSA |
| FANCB |
| FANCE |
| FANCF |
| FANCI |
| FANCM |
| MRE11A |
| RPA1 |

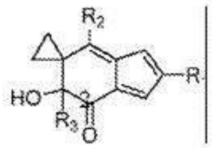
[0017]

[0018] LP184에 대한 민감도와 음의 상관관계를 유의미하게 갖는 몇몇 고순위 유전자 중에서, 몇몇 DDRG(표 1에 열거된 것과 같이, RPA1, FANCE, FANCL, BRIP1, FANCF, MRE11A, BLM, CHEK1, CHEK2, ATM)는 일루딘 또는 LP184 민감도를 개선시킬 수 있다.

[0019] 또 다른 구현예에서, 2개의 마커 PTGR1 및 SDC4가 마커로서 사용되어 일루딘-기반 항암제/치료에 대한 대상체의 민감도를 나타낼 수 있다.

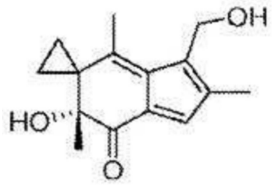
[0020] 본원에 사용되는 것과 같이, 용어 "일루딘"은 유사체 및 화학식 I을 갖는 화합물을 포함한다:

[0021] [화학식 I]

[0022] 

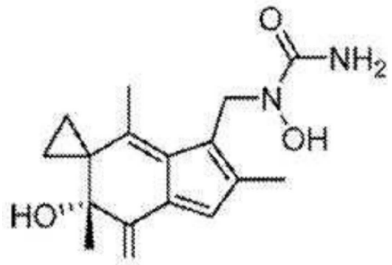

[0023] R1, R2 및 R3은 독립적으로 (C1-C4) 알킬, 메틸, 또는 하이드록실이다. 용어 일루딘은 다음 화학식 II를 갖는 하이드록시메틸아실풀벤(이로풀벤)을 포함할 수 있다:

[0024] [화학식 II]

[0025] 


[0026] 용어 일루딘은 또한 다음 화학식 III을 갖는 하이드록시우레아메틸아실풀벤(LP184)을 포함할 수 있다:

[0027] [화학식 III]

[0028] 


[0029] 일례에서, 일루딘은 유사체 이로풀벤을 포함한다.

[0030] 유전자의 조합이 사용되는 경우, 일루딘-기반 항암제에 노출된 후의 유전자의 DDRG 유전자 조합의 발현 변형을 지수로 삼아 항암제 민감도 증진제의 스크리닝이 수행될 수 있다. 즉, DDRG 전사체 수준이 감소된 암은 항암제에 대한 민감도를 결정한다.

[0031] 유전자의 조합이 사용되는 다른 경우, 일루딘-기반 항암제에 노출된 후의 유전자의 DDRG 유전자 조합의 발현 변형을 지수로 삼아 항암제 민감도 증진제의 스크리닝이 수행될 수 있다. DDRG 또는 DNA 손상 복구 유전자는 BRCA1, BRCA2, ATM, ATR, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5, ERCC6, FANCD2, RAD51 및 PALB2를 포함한다.

[0032] 항암제에 대한 시편의 민감도를 결정하기 위한 본 발명의 방법을 수행하기 위해, 바람직하게는 시편에 존재하는 임의의 물질을 측정하기 위한 프로토콜을 포함하는 키트가 사용된다. 키트는 이러한 물질들 중 임의의 것을 측정하기 위한 시약, 시약의 사용을 위한 사용 설명서의 지시문, 일루딘-기반 항암제에 대한 민감도의 존재 여부를 결정하기 위한 표준물 등을 포함한다. 표준물은 이들 마커의 (상대적) 표준 수준, (상대적) 상위 임계 수준, (상대적) 하위 임계 수준, 측정에 영향을 미치는 인자, 영향의 정도 등을 포함한다. 이러한 물질 수준은 선별된 일루딘-기반 항암제에 적합하도록 설정될 수 있다. 민감도 결정은 표준물에 기초하여 동일한 방식으로 수행될 수 있다.

[0033] 일루딘-기반 항암제의 스크리닝은 일루딘-기반 항암제 민감도 결정 마커를 지수로 삼아 이에 의해 수행될 수 있다.

[0034] 즉, 항암제 민감도 결정 마커의 수준을 *시험관내* 또는 *생체내*에서 변화시킬 수 있는 물질을 항암제로 평가하였다. 예를 들어, *시험관내*의 경우, 물질에 노출된 후에 다양한 암 세포에서 항암제 민감도 결정 마커 수준을 변화시키는 물질은 항암제로서 역할을 할 수 있다. 또한, 암-보유 동물에서 항암제 민감도 결정 마커 수준이 물질의 투여 후에 변화할 때, 물질은 항암제로서 역할을 할 수 있다. 항암제가 약리학적 효과를 나타낼 것으로 예상되는 경우, 종양 수축 또는 세포사멸 효과를 획득하기 전에 항암제 민감도 결정 마커 수준의 증가가 관찰된다. 따라서, 지수로서 항암제 민감도 결정 마커 수준에 기초한 스크리닝은 시험 물질이 유용한 항암제로서의 역할을 하는지의 여부를 더 짧은 시간 동안 결정할 수 있도록 하며, 이로써 항암제의 개발에 수반되는 수고 및 비용이 크게 감소하거나 적어도 개인화될 것으로 예상된다

[0035] 암이 항암제에 대한 민감도를 갖지 않는 경우, 항암제로부터 약리학적 효과가 없거나 더 적을 수 있다. 이처럼 약제학적 효력이 없는 항암제를 환자에게 지속적으로 투여할 경우, 암이 진행되어 부작용이 가중될 수 있다. 따라서, 항암제 민감도 결정 마커는 항암제에 대한 치료 반응을 결정할 뿐만 아니라, 약제학적 효력이 없는 항암제의 지속적 투여로 인해 야기될 수도 있는 부작용이 가중되는 것을 예방하는 데에도 크게 기여할 수 있다.

[0036] 기준값은 각각의 바이오마커에 대해 결정된다. 통상적으로, 기준값은 임계값 또는 구분값일 수 있다. 통상적으로, "임계값" 또는 "구분값"은 실험적으로, 경험적으로 또는 이론적으로 결정될 수 있다. 임계값은 또한 당업자에 의해 인식될 바와 같이, 기존의 실험 및/또는 임상 조건에 기초하여 임의적으로 선택될 수 있다. 임계값은 시험의 함수 및 이익/위험 균형(거짓 양성 및 거짓 음성의 임상 결과)에 따라 최적의 민감도 및 특이성을 획득하기 위해 결정되어야 한다. 당업자는 (본 발명의 방법에 따라 획득된) 바이오마커 발현 수준을 정의된 임계값과 비교할 수 있다. 본 발명의 일 구현예에서, 임계값은 유전자 치료 및 젬시타빈 조합 치료의 반응자인 하나 이상의 대상체로부터 유래된 혈액 샘플에서 결정된 바이오마커 발현 수준(또는 비, 또는 점수)으로부터 유래된다. 본 발명의 일 구현예에서, 임계값은 또한 유전자 치료 및 젬시타빈 조합 치료의 무반응자인 하나 이상의 대상체로부터 유래된 혈액 샘플에서 결정된 바이오마커 발현 수준(또는 비, 또는 점수)으로부터 유래될 수 있다. 또한, 은행에 잘 저장된 과거 대상체 샘플에서 바이오마커 발현 수준(또는 비, 또는 점수)의 소급 측정은 이러한 임계값을 확립하는 데 사용될 수 있다.

[0037] 본원에 사용된 용어 "민감도", "반응성(responsive)" 및 "반응성(responsiveness)"은, 암 치료제(예를 들어, LP184)가 원하는 효과를 가질 (예를 들어, 유도할) 가능성을 지칭하거나, 대안적으로, 세포(예를 들어, 암 세포), 조직(예를 들어, 종양), 또는 암을 앓고 있는 환자(예를 들어, 암을 앓고 있는 사람)에서 치료제에 의해 야기되거나 유도되는 원하는 효과의 강도를 지칭한다. 예를 들어, 원하는 효과는 치료제에 노출되지 않은 암 세포의 성장과 비교하여, 시험관내 암 세포의 성장을 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100% 초과만큼 억제하는 것을 포함할 수 있다. 원하는 효과는 또한 종양 질량을, 예를 들어 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100%만큼 감소시키는 것을 포함할 수 있다. 치료제에 대한 민감도는, 본원에 기술된 NCI60 검정과 같이 치료된 세포의 성장을 세포의 입사 광선의 흡광도의 함수로 측정하는 세포 증식 검정, 예를 들어 세포-기반 검정에 의해 결정될 수 있다. 이러한 검정에서, 더 작은 흡광도는 더 적은 세포 성장, 및 따라서 치료제에 대한 더 작은 민감도를 나타낸다. 성장의 더 큰 감소는 치료제에 대한 더 높은 민감도

를 나타낸다.

[0038] 바이오마커 분석과 일루딘 기반 항암제를 사용한 요법의 조합을 통해 암 치료가 크게 향상되거나 대상체 또는 환자에게 개인화될 수 있다. DDR-결핍 종양은 일루딘 및 LP184에 민감하며, 이는 DDRG 전사체 수준이 감소되거나 없는 고형 종양에 대한 치료제일 수 있다. 요법은 방사선 또는 다른 요법을 포함할 수 있다.

[0039] **실시예**

[0040] **실시예 1: LP-184의 혈장 안정성 및 약동학적 프로파일**

[0041] CD-I 마우스에 1 mg/mL LP-184를 정맥내 볼루스 용량으로 투여하였다. 시점당 3마리의 마우스로부터 샘플을 수집하고, 사전 투여를 포함하는 9개의 시점을 보고하였다.

[0042] LP-184의 혈장 안정성을 2.5 시간에 걸쳐 *시험관내로* 평가하였다. **도 1a**에 나타난 것과 같이, LP-184는 유리한 시험관내 혈장 안정성을 가졌으며, 혈장 농도는 25℃에서 360분 이상(벤치탑) 유지되었다.

[0043] *생체내* 약동학적 데이터를 그래프로 그리고 16.2분의 혈장 반감기를 계산하였다(**도 1b**를 참조함). 계산된 약동학을 표 2에 나타냈다.

[0044] [표 2]

[0045]

| 약동학적 파라미터 | LP-184 |
|---|---|
| 반감기(분) | 16.2 |
| AUC(h*ng/mL) | 517 |
| $C_{최대}$(ng/ml) | 3760 |

[0046] **실시예 2: 종양 세포주의 스펙트럼에서 LP-184의 IC50**

[0047] 종양 세포주의 스펙트럼을 LP-184 효능에 대해 스크리닝하였다. **도 2**는 시험된 52개의 고형 종양 세포주의 로그10 IC50을 나타낸다. 전립선암 세포주 DU145는 시험된 세포주 중에서 LP-184에 가장 민감하였다.

[0048] **실시예 3: 사전 시딩 및 시딩 검정 설계**

[0049] 사전 시딩 검정 및 QA/QC

[0050] 사전 검정 0일차: 조직을 분쇄하고, 실시예 4에 기재된 것과 같이 부드럽게 해리시켰다. 세포를 초저 부착(ULA: ultra-low attachment) 접시에서 밤새 배양하였다.

[0051] 사전 검정 1일차: 오염(QC1)에 대해 배양물을 평가하였다. 이어서 배양물을 500 pm 및 200 pm 필터를 통해 여과하였다. CellTiter-Glo(CTG) 표준 곡선 대 PDX 모델을 사용하여 살아 있는 세포를 정량화하였다. 통과/불합격 체크포인트(QC2)로서 세포 Titer-Gio 검정이 수행되었다. QC2에 실패한 임의의 모델의 추가 바이알을 해동시키고, 해리하고, 밤새 배양하였다. QC2를 통과한 모델은 ULA 접시에서 배양 중으로 유지되었다.

[0052] 사전 검정 2일차 및 3일차: 1일차 단계를 새롭게 해리된 임의의 모델 배양물로 반복하였다. 임의의 모델이 3차 QC2에 실패한 경우, 모델은 생존 불가능한 것으로 간주되어 대체 모델을 그 대신 사용되었다.

[0053] 시딩 후 검정 및 QA/QC

[0054] 검정 0일차: CTG 표준 곡선 대 PDX 모델을 사용하여 살아 있는 세포를 정량화하였다.

[0055] 전체 규모 검정(QC3)을 시딩하기에 충분한지 확인하기 위해 모델의 생존율이 확인되었다. CTG에 기초하여 시딩 밀도를 정규화하고, 검정 플레이트에서 종양 단편을 시딩하였다. 단편을 세포-Tak 코팅된 플레이트에 1시간 동안 부착시켰다. 시험 제제를 도포하고, CTG 및 이미징을 위해 "기준선" 플레이트를 처리하였다.

[0056] 검정 5일차(종점): 전체 시험 제제 용량 반응으로 처리된 검정 플레이트에 대해 CellTiter-Glo 데이터를 수집하였다. CellTiter-Glo 통과/불합격 체크포인트로서, 양성의 대조군 값은 비히클 대조군 값(QC4)보다 유의미하게 더 낮아야 한다. 시험 제제 용량의 하위세트로 처리된 검정 플레이트를 표지하고 이미지화하였다. CTG 및 이미징을 위해 "기준선" 플레이트를 처리하였다.

[0057] 데이터 분석

[0058] 이상값을 제거하기 위해, 용량 반응 곡선을 맞추기 전에 플레이트 전체의 데이터 평균과 관련 치료 조건 내의 데이터 평균 모두에서 2 표준 편차 이상 차이가 나는 데이터 샘플은 자동으로 제거되었다. 이상값은 복제된 데

이터가 최소한 n=4인 경우에만 제거되었다. 적절하다고 여겨지는 경우, 이례적인 데이터 샘플은 수동으로 제거하였다. 회귀 분석을 완료하기 위해, 용량 반응 곡선을 그래프로 그리고, 적합도의 $R^2$ 값이 0.65 이상인 경우에 EC50 값을 보고하였다.

[0059] 엄격하게 표준화된 평균 차이(SSMD)는 데이터 포인트에 대해 평가되었고;

[0060] SSMD가 1.5 이상이지만, SSMD가 20 미만인 경우, SSMD 값이 데이터 포인트에 대해 인쇄되고;

[0061] SSMD가 2 이상인 경우, SSMD 값이 볼드체로 인쇄되고;

[0062] SSMD가 20 이상인 경우, 그 값은 ">20" 또는 "<20"으로 적절하게 인쇄된다.

[0063] CellTiter-Glo 데이터의 결과를 음성 (비히클) 대조군에 대해 정규화된 생존율%로 보고하였다. 생염료/항체 팔레트의 대표 이미지는 다음에 대해 포함된다: 음성 대조군, 양성 대조군, 및 2회 용량의 시험 제제. 생염료 팔레트는 다음으로 이루어졌다: Hoechst(모든 핵), CellTracker Green(살아 있는 세포 염료), p-γH2A.X(DNA 손상 마커), EdU(혼입은 S-상을 나타냄).

[0064] **실시예 4: 종양 해리, 시딩 및 치료**

[0065] 동결보존된 종양을 해동시키고, 수동으로 2 mm 조각으로 해리시켰다. 수동 해리 후, 종양을 Miltenyi GentleMAC 시스템(캘리포니아주 오번 소재의 Miltenyi Biotec)을 통해 추가로 해리시켰다. 해리된 종양 단편을 초저 부착 플레이트에서 밤새 (및 최대 7일) 배양하였다. CellTiter-Glo를 통해 생존율을 평가하기 전에 500 pm 또는 200 pm 필터를 통해 종양 단편을 여과하였다. 종양 단편을 세포-Tak 코팅된, 384-웰 저부피 COC 플레이트에 시딩하고, 코팅된 표면에 1시간 부착하였다. 부착 후, 종양 단편을 음성 대조군, 양성 대조군, 및 시험 제제로 처리하였다. 음성 대조군은 DMSO 가용성 시험 제제의 경우 0.1% DMSO 및 수성 시험 제제의 경우 PBS로 구성되었다. 양성 대조군은 완전 배지에서 10% DMSO를 포함한다. 이어서, 검정 기간 동안 플레이트를 37℃ 및 5% $CO_2$에서 항온처리하였다.

[0066] **실시예 5: 생염료/항체 팔레트로 표지된 종양 단편 이미징**

[0067] 살아 있는 종양 단편을 EdU로 3시간 동안, CellTracker Green CMFDA로 1시간 동안 펄싱한 후 PBS에서 4% PFA로 고정하였다. EdU는 S-상 성장의 마커로서 DNA 내로 혼입된다. CellTracker Green CMFDA는 살아 있는 세포 염료이다. 고정 후, EdU 신호는 Thermo Fisher Click-IT EdU Alexa Fluor 647 HCS 검정(매사추세츠주 월섬 소재의 Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 제조사의 지침에 따라 전개된다. 이어서, CellTracker- 및 EdU-표지된 플레이트를 표준 면역형광 프로토콜을 통해 항체로 표지하였다. 마지막으로, 종양 단편을 Hoechst 범핵 마커로 표지하였다. Thermo Fisher CX7-LED HCS 또는 CX7-LZR HCS 플랫폼을 사용하여 플레이트를 이미지화하였다.

[0068] **실시예 6: NER 경로 유전자의 전사체 수준과 음의 상관관계를 갖는 LP-184 민감도**

[0069] 췌장암 또는 종양의 15 내지 20% 하위세트는 DNA 복구 경로 (BRCA1/BRCA2/PALB2/RAD51/ATM/FANCD2)에서 돌연변이를 보유한다. 또한 PDAC의 ~5%에서 뉴클레오티드 절제 복구(NER) 유전자(ERCC2/3/4/5/6)의 돌연변이가 보고되었다. LP-184는 새로운 합성 소분자 아실풀벤 유사체이다. 일단 PTGR1에 의해 활성화되면, 고도로 반응성인 LP-184 친핵체는 전사(TC-NER) 및/또는 상동성 재조합(HR)에 결합된 뉴클레오티드 절제 복구(NER) 메커니즘을 통해 선택적으로 복구되는 공유 DNA 부가물을 생성한다. 돌연변이 또는 발현 유도 TC-NER 및 HR 결핍은 PDAC 세포가 LP-184에 대해 민감도가 증가하도록 한다.

[0070] 결과: DNA 복구-결핍 종양에서 LP-184 활성. *시험관내, 생체외* 및 이종이식에서 유전적으로 정의된 PDAC 모델의 LP-184 화학 민감도. 6개의 상이한 췌장암 세포주(카판-1, CFPAC-1, 패널, MiaPaCa2, Panc03.27 및 BxPC-3)에서 시험한 결과, 114 내지 182 nM 범위의 LP-184 IC50 값으로 매우 강력한 억제가 초래되었다. 이러한 세포주 패널에서, LP-184 민감도는 NER 경로 유전자 ERCC8(r = -0.94)의 전사체 수준과 음의 상관관계를 가졌다. 이들 PDAC 세포주와 비교하여, 정상적인 췌장 상피 세포주 HPNE는 LP-184에 3 내지 6배 덜 민감하였다(IC50 670 nM). HR 결핍이 있는 5개의 저통과 환자-유래 이종이식편 중 4개의 *생체외* 배양은 45 내지 270 nM 범위의 IC50으로 LP-184에 대한 나노몰 민감도를 나타냈다. 이러한 종양 이식편 모델은 동일한 검정에서 올라파립에 대해 적어도 6배 덜 민감하였다. ERCC4의 고갈은 모체 세포주에 비해 LP-184에 대한 민감도를 약 2배 향상시켰다.

[0071] PTGR1을 LP-184 활성에 대한 바이오마커로서 정의하기 위해, CRISPR/Cas9-매개 유전자 편집은 PTGR1 발현을 고갈시켰다. PTGR1-null Capan-1 세포주 유래 이종이식편은 LP184에 불량하게 민감하였지만, PTGR1-발현 이종이

식편은 이 연구에서 대조군에 비해 109%의 종양 성장 억제와 함께 모든 LP184 치료된 동물에서 거의 완전한 종양의 퇴행을 보여주었다. 또한, PTGR1 고갈 세포는 *시험관내*에서 LP184에 완전히 저항성이었다 .

[0072] 요약. 데이터는 다양한 DNA 복구 경로 돌연변이를 지닌 PDAC 모델이 *시험관내* 및 *생체내*에서 LP-184에 매우 민감하다는 것을 보여준다. 증가된 PTGR1 발현은 LP184 세포독성에 대한 검증된 바이오마커이며, 활성 알킬화기 약물에 대한 LP184의 배타적 전환효소이다.

[0073] 표 3은 유전자 상관관계 및 약물 민감도를 보여준다.

[0074] [표 3]

[0075]

| 모델 | 종양 유형 | LP-184 IC 50[nM] | 최대 억제(%) | 올라파립 IC50[nM] | 최대 억제(%) | DDR 유전자 돌연변이 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| CTG-0166 | NSCLC | 57 | 97 | 720 | 77 | ATM, FANCD2, NBN |
| CTG-1194 | NSCLC | 31 | 91 | NR | 52 | ATM |
| CTG-2532 | NSCLC | 54 | 99 | 17000 | 81 | CHEK1, FANCA, NBN, RAD50 |
| CTG-0302 | 췌장 | 110 | 91 | NR | 46 | BRCA2, ATM, BLM, FANCA |
| CTG-0314 | 췌장 | 27 | 82 | 1700 | 80 | BRCA2, CDK12, PALB2 |
| CTG-0381 | 췌장 | 2900 | 94 | QC 실패 | QC 실패 | BRCA1, BRCA2, ATM |
| CTG-1522 | 췌장 | 45 | 97 | 7900 | 81 | ATR, BRIP1, PARP1 |
| CTG-1643 | 췌장 | 57 | 77 | NR | 65 | BRCA1, BRIP1, |
| CTG-2429 | 전립선 | 92 | 92 | 18000 | 68 | ATM, ATR, PALB2, |
| CTG-2440 | 전립선 | 31 | 95 | NR | 59 | PMS2 |
| CTG-3167 | 전립선 | 54 | 97 | 4200 | 48 | BRCA2, ATM, FANCA, FANCI, FANCM |
| CTG-3537 | 전립선 | 54 | 98 | NR | 29 | BRCA2, CDK12, FANCI, RAD54L, |

[0076] 위의 표는 첨부된 방법에 표시된 기본 단계를 사용하여 얻은 것이다.

[0077] **실시예 7: 특정 DDR 결함을 갖는 종양의 치료에서 치사제로서의 LP-184**

[0078] LP-184 민감도의 향상을 입증하기 위해, 표준 크리스퍼(CRISPR) 기술을 사용하여 뉴클레오티드 절제 복구/TC-NER 성분에 결합된 전사인, ERCC4가 췌장암 Panc03.27 세포에서 억제되었다. **도 3**에 나타난 것과 같이, ERCC4의 억제는 이소겐성 부모 크리스퍼(CRISPR) 제어에 비해 대략 2배 LP-184 민감도를 향상시킨다.

[0079] LP-184는 특정 DNA 손상 복구(DDR) 결함을 갖는 종양의 치료에서 합성 치사제가 될 가능성을 갖는다.

[0080] **실시예 8: DDR 돌연변이를 갖는 전립선암 세포에서 LP-184 효력**

[0081] LP-184는 손상 DDR 돌연변이를 보유하는 전립선암 세포주에서 나노몰 *시험관내* 효력을 보여준다.

[0082] 표준 크리스퍼(CRISPR) 기술을 사용하여 손상 DDR 유전자 돌연변이로 3개의 전립선암 세포주를 유도하였다. BRCA2 돌연변이로 세포주 22RV1을 유도하였다. ERCC6 및 FANCI 돌연변이로 DU145 세포를 유도하였다. ATM 및 ERCC3 돌연변이로 LNCAP 세포를 유도하였다. 표 4는 손상 DDR 돌연변이를 보유하는 전립선암 세포주에서 나노몰 *시험관내* 효력을 보여준다.

[0083] [표 4]

[0084]

| 전립선암 세포주 | 손상 DDR 유전자 돌연변이 | LP-184 IC50(nM) |
|---|---|---|
| 22RV1 | BRCA2 | 20.5 |
| DU145 | ERCC6, FANCI | 44.9 |
| LNCAP | ATM, ERCC3 | 219 |

[0085] **실시예 9: BRCA2-고갈 암 세포에서 LP-184에 대한 민감도 증가**

[0086] BRCA2-고갈 PC3M 사람 전립선암 세포를 LP-184 및 PARP 억제제 올라파립(Lynparza®)으로 치료하였다. **도 4a**는 LP-184로 치료한 후, 모세포와 비교하여 PC3M(BRCA 2-) 세포에서 억제된 성장을 보여준다. 특허받은 PC3M 세포에서 계산된 3024 nM의 IC50은 BRCA2- 고갈 후의 세포에서 340 nM으로 9배 감소한다. 대조적으로, **도 4b**는 BRCA2 고갈 후의 PC3M 세포에서 PARP 억제제 올라파립을 사용한 치료에 대한 민감도에 유의미한 변화가 없음을 보여준다.

[0087] 올라파립으로 치료한 BRCA2-고갈 세포와 LP184 사이의 IC50의 비교는 올라파립에 비해 LP-184에 대해 8배 증가된 민감도를 나타낸다.

[0088] **실시예 10: DDR 돌연변이를 갖는 암 세포에서의 용량 의존적 세포 사멸**

[0089] BRCA2 및 CHEK2 돌연변이를 불활성화하는 전립선암 PDX 모델인 LuCaP96 세포를 오가노이드로서 증식시켰다. 배

양에서 살아 있는 세포와 죽은 세포의 염색이 **도 5a**에 나타나 있으며, 살아 있는 세포로부터 죽은 세포로의 용량 의존적 이동을 나타낸다. **도 5b**는 각각의 치료 용량에서 오가노이드의 정량화를 나타내며, 77 nM의 IC50을 나타낸다. **도 5c**에 나타난 각각의 치료 용량에서 죽은 세포의 상응하는 정량화는 더 높은 용량으로 죽은 세포가 증가한 것을 보여준다. LP-184를 사용한 치료는 전립선암 오가노이드 모델에서 나노몰 범위의 용량 의존적 세포 사멸을 나타낸다.

[0090] **실시예 11: NER 유전자 발현에 기초한 LP-184 민감도의 예측**

[0091] 다음의 NER 유전자의 발현 수준은 TCGA(The Cancer Genome Atlas)로부터의 총 166개 기록의 상위 15개의 예측된 민감성 교모세포종 및 상위 15개의 예측된 비민감성 교모세포종(GBM) 종양 샘플 기록을 별개의 민감도 군으로 분류할 수 있었던 반면, 성별 및 인종과 같은 파라미터로는 샘플을 분류할 수 없었다. 유전자는 다음을 포함한다: POLE2, RFC3, POLE, LIG1, PARP2, RFC5, LIG3, RFC4, INO80B, POLR2F, PCNA, ACTR5, POLDI, GPS1, NFRKB, XAB2, POLRD2, POLD3, INO80E, ZNF830, ERCC4, ERCC8, POLE3, RPA2, GTF2H4, PARP1, ERCC3, POLR2B, RUVBL1, MCRS1, USP45, COPS5, POLR21, COPS3, UBE2N, INO80D, PRPF19, COPS7B, XRCC1, ERCC6, UBE2I, POLR2E, CCNH, ACTR8, USP7, POLR2G, UBB, ERCC5, INO80C, RPA1, POLR2J, UBE2V2, POLR2H, RPA3, AQR, RFC1, PPIE, POLD2, ERCC2, POLE4, SUMO4, COPS4, YY1, RAD23A, COPS6, XPA, MNATI, POLR2K, RAD23B, CUL4B, POLR2A, PIAS1, ISY1, GTF2H5, POLK, EP300, UBA52, XPC, ERCC1, RBX1, RNF111, TCEAI, GTF2H3, CUL4A, 1NO80, COPS7A, COPS8, RPS27A, PIAS3, TFPT, GTF2H2, CETN2. SUMO3, CHD1L, GTF2H1, COPS2, UBC, CDK7, ACTS, POLR2L, ELL, DDB2, POLD4

[0092] t-SNE 분석을 사용하여 GBM 환자 발현 데이터를 그래프로 그렸다. t-SNE 군집은 LP-184 민감도가 뚜렷하게 예측된 NER 유전자의 발현이 높거나 낮은 하위 그룹을 식별했다. **도 6**은 NER 그룹 1로부터의 15/16 GBM 샘플을 나타내며 LP-184에 민감한 것으로 예측되었다.

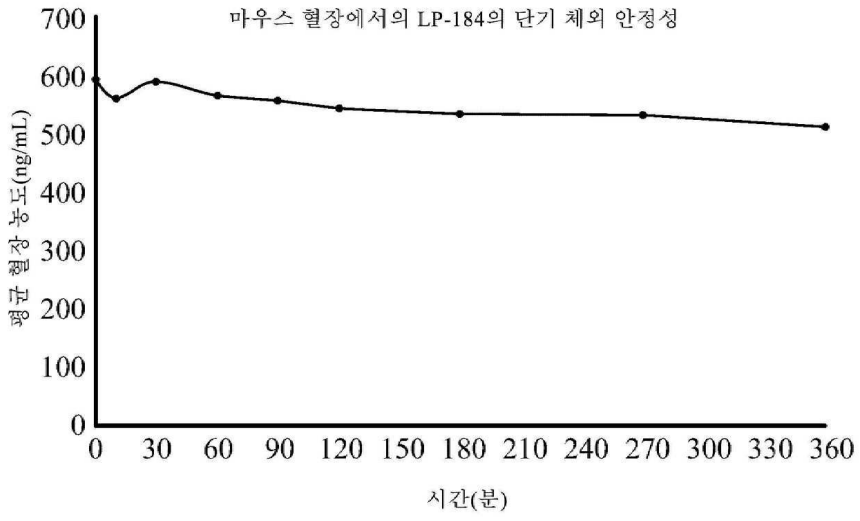
[0093] **실시예 12: 낮은 ERCC3/6 발현을 갖는 GBM에서 예측된 LP-184 민감도**

[0094] NER 유전자 ERCC3/6의 평가된 발현을 갖는 임상 GBM으로부터의 TCGA 데이터를 예측된 LP-184 민감도에 대해 그래프로 그렸다(N = 173). **도 7**은 NER 유전자 ERCC3/6의 낮은 발현을 갖는 GBM이 평가 가능한 GBM TCGA 기록 전체에서 높은 발현을 갖는 GBM에 비해 LP-184에 더 민감한 것으로 예측되었음을 보여준다.

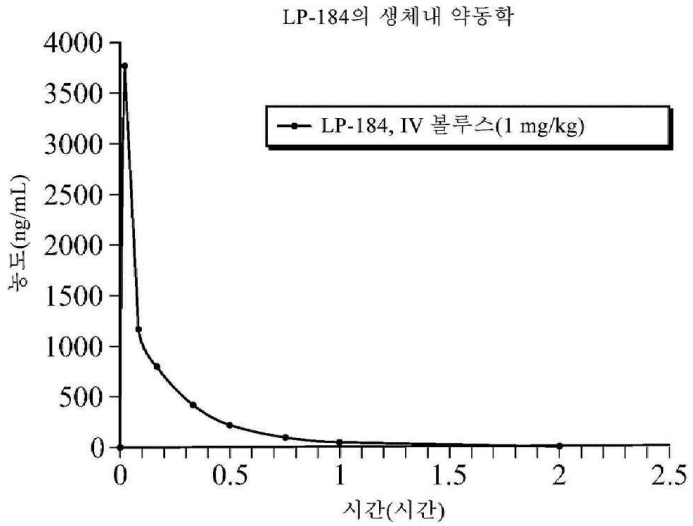
[0095] 본 발명의 바람직한 구현예가 본원에 도시되고 설명되었지만, 이러한 구현예는 단지 예로서 제공된다는 것이 당업자에게 명백할 것이다. 이제 본 발명으로부터 벗어남 없이 당업자에게 많은 변형, 변경 및 치환이 발생할 것이다. 본원에 기술된 본 발명의 구현예에 대한 다양한 대안이 본 발명을 실시하는 데 이용될 수 있음을 이해해야 한다. 다음의 청구범위는 본 발명의 범주를 정의하고, 이러한 청구범위 내의 방법 및 구조와 이들의 등가물이 이에 의해 포함되는 것으로 의도된다.

## *도면*

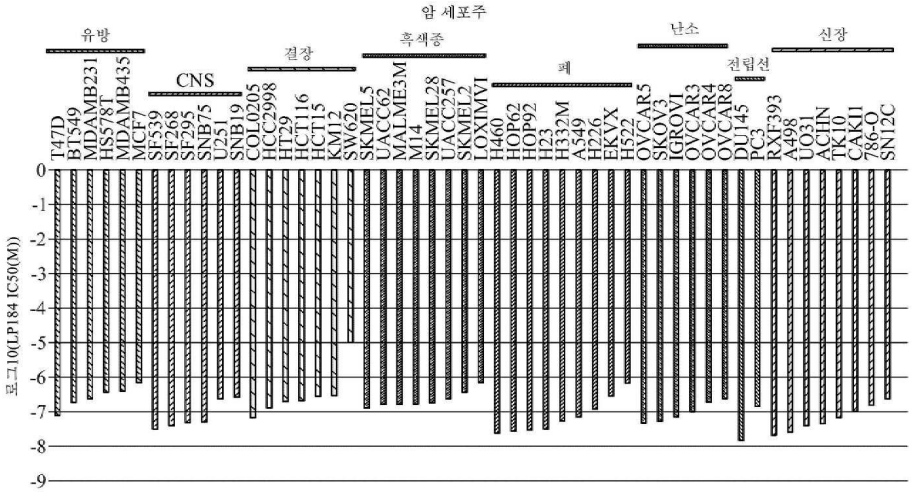
### *도면1a*



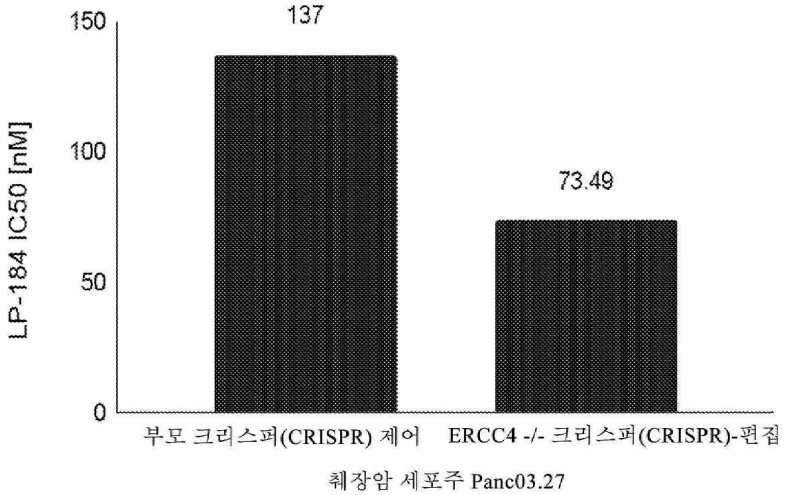
도면1b


LP-184의 생체내 약동학
LP-184, IV 볼루스(1 mg/kg)
농도(ng/mL)
시간(시간)
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
0.5
1
1.5
2
2.5

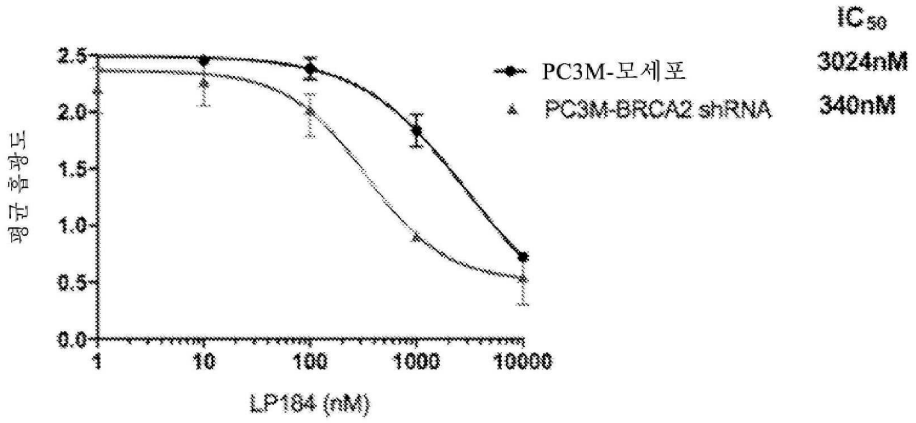
도면2


암 세포주
유방
CNS
결장
흑색종
폐
난소
전립선
신장
T47D
BT549
MDAMB231
HS578T
MDAMB435
MCF7
SF539
SF268
SF295
SNB75
U251
SNB19
COL0205
HCC2998
HT29
HCT116
HCT15
KM12
SW620
SKMEL5
UACC62
MALME3M
M14
SKMEL28
UACC257
SKMEL2
LOXIMVI
H460
HOP62
HOP92
H23
H332M
A549
H226
EKVX
H522
OVCAR5
SKOV3
IGROV1
OVCAR3
OVCAR4
OVCAR8
DU145
PC3
RXF393
A498
UO31
ACHN
TK10
CAKI1
786-O
SN12C
로그10(LP184 IC50(M))
0
-1
-2
-3
-4
-5
-6
-7
-8
-9

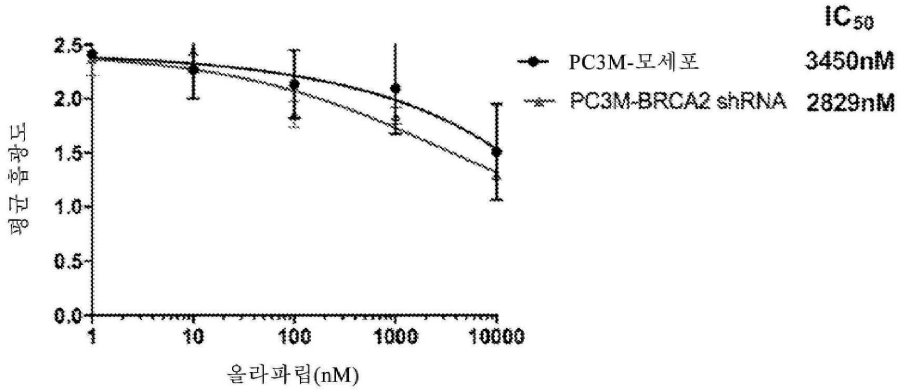
도면3


LP-184 IC50 [nM]
150
100
50
0
137
73.49
부모 크리스퍼(CRISPR) 제어
ERCC4 -/- 크리스퍼(CRISPR)-편집
췌장암 세포주 Panc03.27

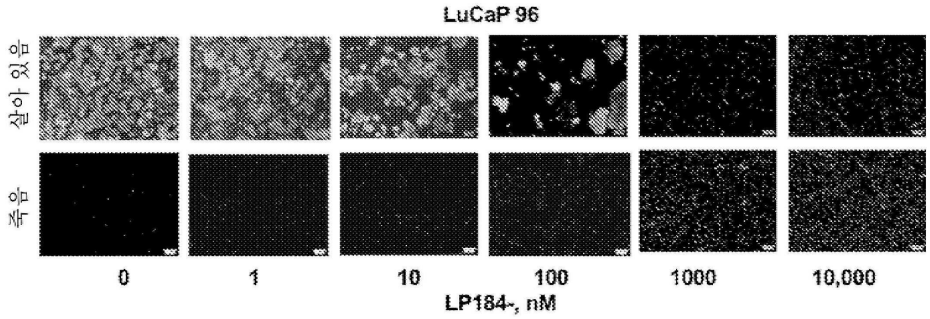
도면4a



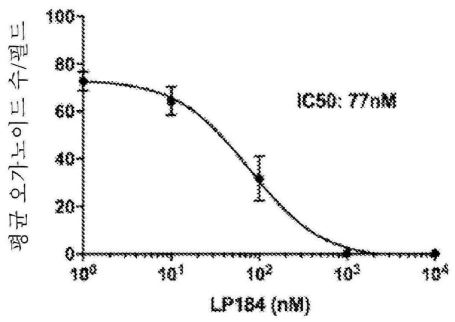

도면4b



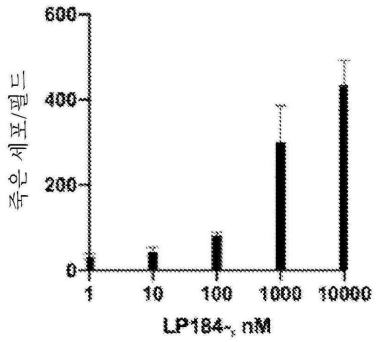

도면5a



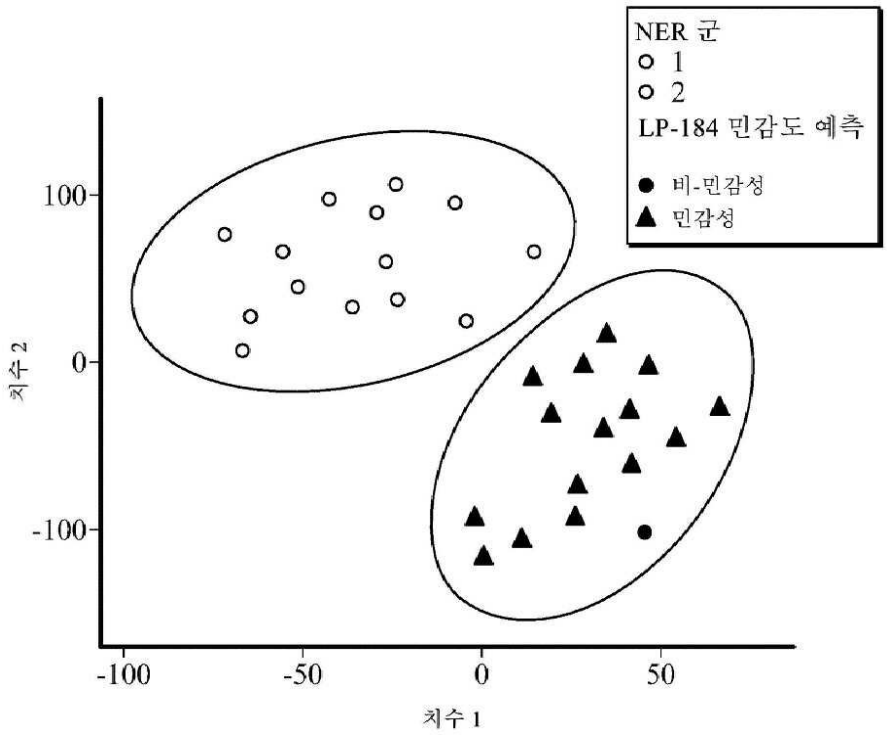

도면5b



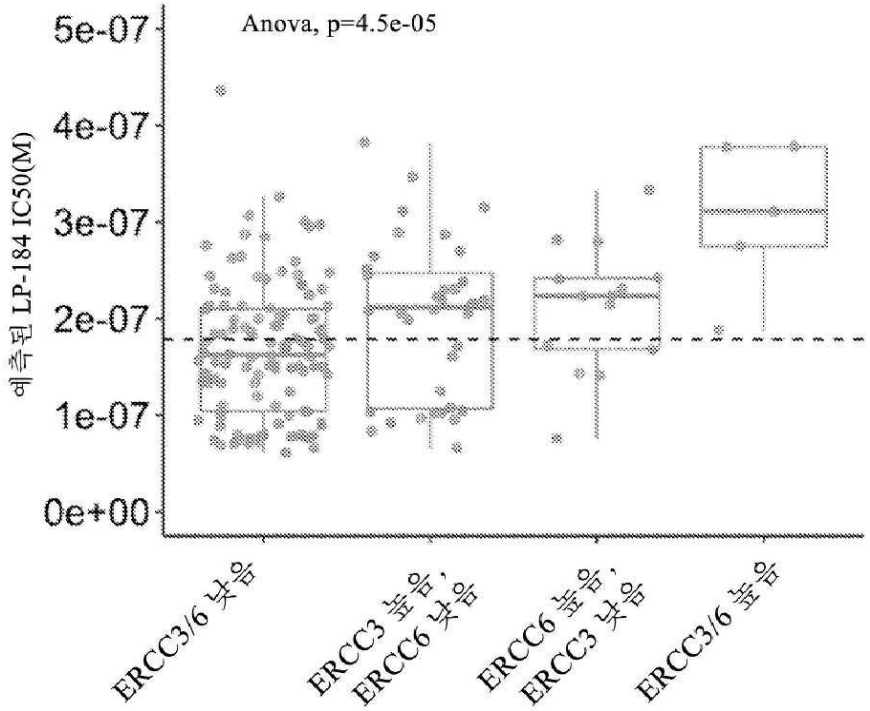
도면5c


600
400
200
0
죽은 세포/웰 드
1
10
100
1000
10000
LP184-, nM

도면6


NER 군
1
2
LP-184 민감도 예측
비-민감성
민감성
100
0
-100
치수 2
-100
-50
0
50
치수 1

도면7


Anova, p=4.5e-05
예측된 LP-184 IC50(M)
5e-07
4e-07
3e-07
2e-07
1e-07
0e+00
ERCC3/6 낮음
ERCC3 높음, ERCC6 낮음
ERCC6 높음, ERCC3 낮음
ERCC3/6 높음