



[URC102의 in silico MoA 분석]

작성일 : 2023.05.08.

Confidentiality Statement

This document is the property of Oncocross Ltd. and is confidential. The information contained herein is believed to be accurate as of the date of preparation.

Contents

| | |
|--|-----------|
| Pathway analysis from RAPTOR AI DEG score | 3 |
| Large category pathway analysis..... | 3 |
| Sub-category pathway analysis | 4 |
| Target prediction based on chemical structure | 8 |
| Conclusion | 10 |

Pathway analysis from RAPTOR AI DEG score

RAPTOR AI는 질병과 약물의 전사체를 input으로 하여 각 sample에 대한 DEG (Differentially Expressed Genes)를 선별하고 차별 발현 정도에 따른 점수를 1~0범위로 나타냅니다. Reactome^[1]과 public DB들을 기반으로 하여 pathway별 gene set을 정의 하였고, RAPTOR에서 선정된 DEG와 점수를 이용해 GSEA(Gene Set Enrichment Analysis)를 수행하였습니다.

이번 URC102의 RNA sequencing 데이터는 PC3, HL60, MCF7 세 가지 cell line에 대한 실험을 통해 얻어진 것입니다. RAPTOR의 pathway 분석에서는 각 cell line별 약물 반응을 pathway에 반영할 수 있는 최종 4232개의 gene을 선정하고 score를 계산하였습니다. 세 가지 cell line에서 모두 DEG로 선별된 유전자는 총 9가지이며 down DEG 4가지(CROCCP3, INHBB, SIX4, RUNX2)와 up DEG 5가지(DEPDC5, C4orf33, ZNF684, DEPDC1B, COMMD3-BMI1)입니다. 이 중 DEPDC5의 mutation은 loss of function에서 seizure와 familial mesial temporal lobe epilepsy, infantile spasms 유발함이 알려져 있습니다.

Large category pathway analysis

대분류 pathway에 대한 GSEA분석을 진행하였으며, 선정된 약물의 gene set과 각 pathway의 gene set에서 최소한 15개 이상의 공통 유전자가 있는 경우만을 선별하였습니다. 아래 표 1은 Normalized enrichment score(NES) 순으로 나타내어진 대분류 pathway를 나타냅니다. 굵은 글씨로 표시된 상위 두 가지 분류에 대해서는 하위 분류 분석을 추가로 수행하였습니다.

| Pathway name | NES |
|-----------------------------------|----------|
| Biological oxidations | 1.309097 |
| Neuronal System | 1.255786 |
| Extracellular matrix organization | 0.999324 |
| Signaling by GPCR | 0.979085 |
| Sensory Perception | 0.925016 |
| Signaling by NTRKs | 0.923111 |
| Metabolism of lipids | 0.910834 |
| Metabolism of carbohydrates | 0.910555 |
| PI3K/AKT Signaling in Cancer | 0.823546 |

| | |
|------------------------------|----------|
| Transport of small molecules | 0.798079 |
|------------------------------|----------|

표 1 URC102의 대분류 pathway에 대한 GSEA 결과

비교적 좁은 범위의 pathway인 NTRKs와 PI3K/AKT 에 관련해서는 epilepsy와 관련한 문헌을 찾을 수 있었습니다. [2][3][4][5]

Sub-category pathway analysis

각 대분류 pathway는 하위 분류로 구성되어 있으며 gene set 또한 하위 분류의 gene set의 합집합입니다. 하위 분류는 세분화 될수록 gene set의 크기가 아주 작은 pathway가 다수 존재하기 때문에 pathway 선정에 최소 공통 유전자 수를 정의하지 않았으며(대분류에서는 공통 유전자 15개 이상만 선정), normalization 과정에서 gene set의 크기를 보정하는 gene set permutation 구성에 왜곡이 생길 수 있습니다. 약물에 대한 gene set이 DEG만을 선별하여 정의한 것이므로 점수가 높은 pathway가 더 유의미할 수 있지만 마이너스 점수라고 하여 유의미하게 관련이 없는 pathway라는 의미는 아닙니다.

Biological oxidations은 표 2와 같이 3가지 하위 분류로 구성되어 있으며 3가지 분류 중 Phase II 관련 경로가 URC102의 전사체 패턴과 가장 연관이 있는 것으로 보여집니다.

| Pathway name | NES |
|---|-----------------|
| Phase II - Conjugation of compounds | 1.663261 |
| Metabolic disorders of biological oxidation enzymes | 0.790669 |
| Phase I - Functionalization of compounds | -0.70001 |

표 2 URC102의 Biological oxidations 하위 분류 pathway에 대한 GSEA 결과

CTD Gene-Disease Associations dataset에서 seizure 관련 gene 목록 (3742개), Phase2 metabolism gene set list (110개), RAPTOR DEG (4232개)에 대해서 공통으로 존재하는 유전자는 [GSTA1, SULT1A3, GCLM, PAPSS2, CHAC1, GSTA4, UGT1A1, GSTO1, AS3MT, CNBP2] 10가지 입니다.

Neuronal System은 Diseases associated with visual transduction, Potassium Channels, Protein-protein interactions at synapses, Transmission across Chemical Synapses, Transmission across

Electrical Synapses의 5가지 하위 분류로 구성되어 있습니다. 아래 표 3은 Neuronal System의 하위 분류와 그것의 하위 분류를 한번 더 GSEA 분석하여 나타낸 표입니다. 유의미한 상위 점수를 보인 하위분류 4 가지(Diseases associated with visual transduction, Voltage gated Potassium channels, HCN channels, Receptor-type tyrosine-protein phosphatases, Presynaptic depolarization and calcium channel opening) 를 굵은 글씨로 표시하였고 간질과의 연관성을 조사하였습니다.

| Pathway name | NES |
|---|-----------------|
| Diseases associated with visual transduction | 1.406017 |
| Potassium Channels | 0.988268 |
| Voltage gated Potassium channels | 1.042228 |
| HCN channels | 0.917776 |
| Inwardly rectifying K ⁺ channels | 0.827462 |
| Ca ²⁺ activated K ⁺ channels | -0.67531 |
| Tandem pore domain potassium channels | -0.88033 |
| Protein-protein interactions at synapses | 0.979257 |
| Receptor-type tyrosine-protein phosphatases | 1.580357 |
| Synaptic adhesion-like molecules | -0.56178 |
| Neurexins and neuroligins | -0.89152 |
| Transmission across Chemical Synapses | 0.842683 |
| Presynaptic depolarization and calcium channel opening | 1.291863 |
| Neurotransmitter clearance | 0.818036 |
| Neurotransmitter release cycle | 0.766401 |
| Neurotransmitter uptake and metabolism In glial cells | 0.673337 |
| Neurotransmitter receptors and postsynaptic | 0.672866 |

| | |
|---|----------|
| signal transmission | |
| Transmission across Electrical Synapses | -1.17308 |

표 3 URC102의 Neuronal System 하위 분류 pathway에 대한 GSEA 결과.

*색이 연한 행은 진한 행의 하위 분류임

1) Diseases associated with visual transduction

Diseases associated with visual transduction의 gene set은 13개이며, URC102 약물 발현 DEG 중 이 pathway에 속하는 유전자는 RBP1, RDH5 입니다. 작은 gene set 크기로 인해 normalization에서 큰 점수를 가지게 될 가능성도 있습니다. RBP1는 간질 환자 샘플에서 높게 up regulation 되어 있고^[6] 당사 실험 데이터에서는 URC102를 처리한 PC3 cell에서 높은 점수로 down regulation되어 있는것을 확인하였습니다.

2) Voltage gated Potassium channels

Voltage gated Potassium channels은 모든 신경 전달관련 채널이 그러하듯이 대부분 관련 유전자는 간질과의 연관성이 많이 밝혀져 있습니다. 해당 pathway에 속하는 URC102의 DEG는 KCNAB3, KCND1, KCND1, KCNF1, KCNH2, KCNH2, KCNH4, KCNH5, KCNS1 (down regulation), KCNQ1, KCNH3 (up regulation)이 있습니다.

3) HCN channels

Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN)의 current는 dendritic summation, suppresses dendritic calcium spikes, and enables inhibitory GABA-mediated postsynaptic potentials를 감소시키며, 그 결과 epilepsy를 억제한다고 알려져 있습니다.^[7] 소아기 유전성 간질과 HCN1과의 관계가 밝혀진 문헌들이 있으며, HCN1은 loss of function에서 간질을 유발하는 것으로 밝혀졌습니다.^[8]

HCN channels의 gene set은 HCN1,2,3,4 네가지 밖에 없기 때문에 그 중 하나의 gene만 발현이 되어도 전체 gene set에 비해 많은 비중을 차지하는 결과가 되어 왜곡된 높은 점수를 얻을 확률이 존재합니다. 당사에서 실험한 URC102 데이터에서는 PC3 cell 에서 HCN3만이 up DEG로 측정되었습니다.

4) Receptor-type tyrosine-protein phosphatases

20개의 유전자로 이루어진 작은 gene set이며 이중 6개의 유전자가 URC102의 DEG에서 나타납니다. 그 중 PTPRD와 PPFIBP1은 다른 DEG 발현에 비해 유의미하게 큰 차이를 보였습니다.

PTPRD는 loss of function일 때 간질을 유발하며^[9], UCR102의 DEG 분석에서는 PC3 cell에서 up regulation 되었습니다. PPFIBP1 또한 loss of function일 때 간질을 유발하나^[10], UCR102의 DEG 분석 또한 MFC7 cell에서 down regulation 되었습니다.

5) Presynaptic depolarization and calcium channel opening

다른 모든 신경 전달 채널과 마찬가지로 칼슘 채널 또한 간질에 영향을 끼칩니다. voltage-dependent calcium channel인 CACN subtype들로만 구성되어 있는 작은 gene set이고 영아 간질성 뇌병증에 관련 깊은 gene들로 알려져 있습니다. 해당 pathway에 속하는 URC102의 DEG는 CACNA1E와 CACNA2D3입니다. 실험데이터에서 나타난 CACNA1E는 HL60 cell에서 down DEG로 측정 되었고 gain of function 변이에서 간질이 알려져 있습니다.^[11] CACNA2D3 또한 HL60 cell에서 down DEG로 측정되었고, 직접 알려지진 않았지만 A2D family가 간질과 간질약의 작용에 관련이 있으며 마찬가지로 gain of function에서 과전류로 인한 간질이 연구되었습니다.

표 4는 위의 열거한 주요 발현 유전자와 간질과의 알려진 관계를 정리한 내용입니다.

| 유전자 | 알려진 간질 유발 변이 | URC102처리시 변화 |
|---------|-------------------------|---------------------|
| DEPDC5 | loss of function | up regulation |
| RBP1 | 간질환자 샘플에서 up regulation | down regulation |
| PTPRD | loss of function | up regulation |
| PPFIBP1 | loss of function | down regulation |
| CACNA1E | gain of function | down regulation |
| HCN | HCN1의 loss of function | HCN3의 up regulation |

표 4 URC102의 DEG 변화와 간질과의 관계

Target prediction based on chemical structure

URC102의 약물 구조를 이용하여 AI 모델 타겟 추천과 추천된 타겟에 대한 docking simulation을 진행하였습니다. 6개 모델을 앙상블 하여 5개 모델에서 공통으로 상위에 도출되었고 예측 확률 점수가 50% 이상으로 계산된 2가지 MoA를 선정하였습니다. Benzodiazepine receptor(GABAA)가 가장 유력한 타겟으로 도출되었으며, benzodiazepine은 기존 간질에도 처방 가능한 약물군으로 URC102의 기존 실험 내용과 크게 벗어나지 않는 결과로 여겨집니다.

| MoA Prediction | Average Score |
|-------------------------|---------------|
| Benzodiazepine receptor | 0.70 ± 0.30 |
| Glutamate receptor | 0.56 ± 0.19 |

표 5 URC102의 구조 기반 MoA prediction model 결과

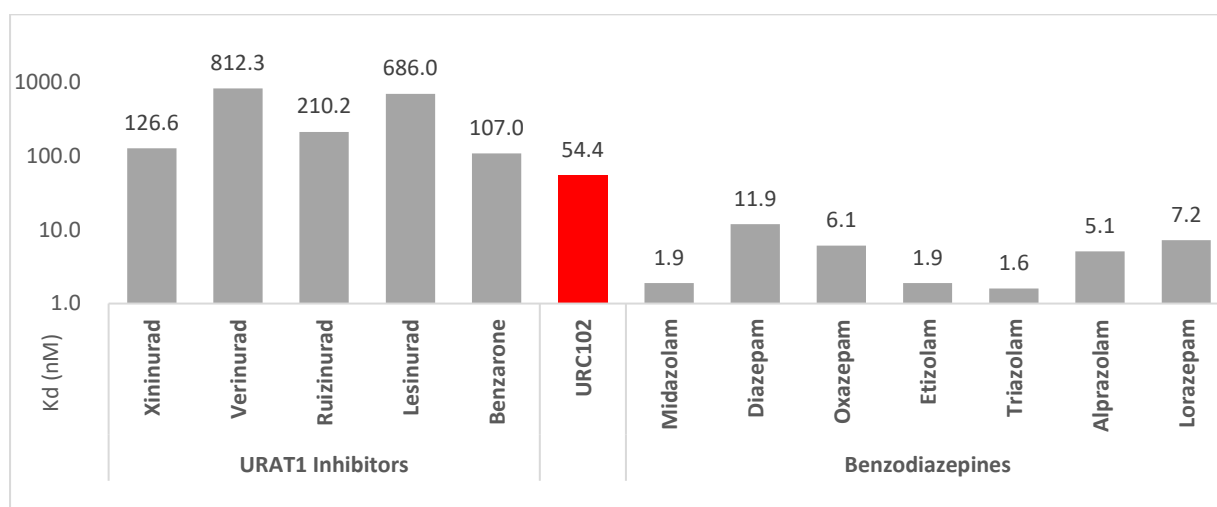


그림 1 UR1102, benzodiazepines, URAT1 inhibitors의 GABAA receptor에 대한 docking simulation 결과

그림 1은 URC102와 benzodiazepine류 약물, 그리고 URAT1 inhibitor로 알려진 약물들을 GABAA receptor에 docking simulation하여 얻은 Kd값입니다. 값이 낮을 수록 receptor와 친화력이 높은것을 의미합니다. 로그 지수로 나타난 y축에서 다른 URAT1 inhibitor 대비 URC102가 benzodiazepine류 약물과 높은 구조 유사성을 보이고 docking 결합력 또한 높게 나오는 것을 확

인할 수 있습니다.

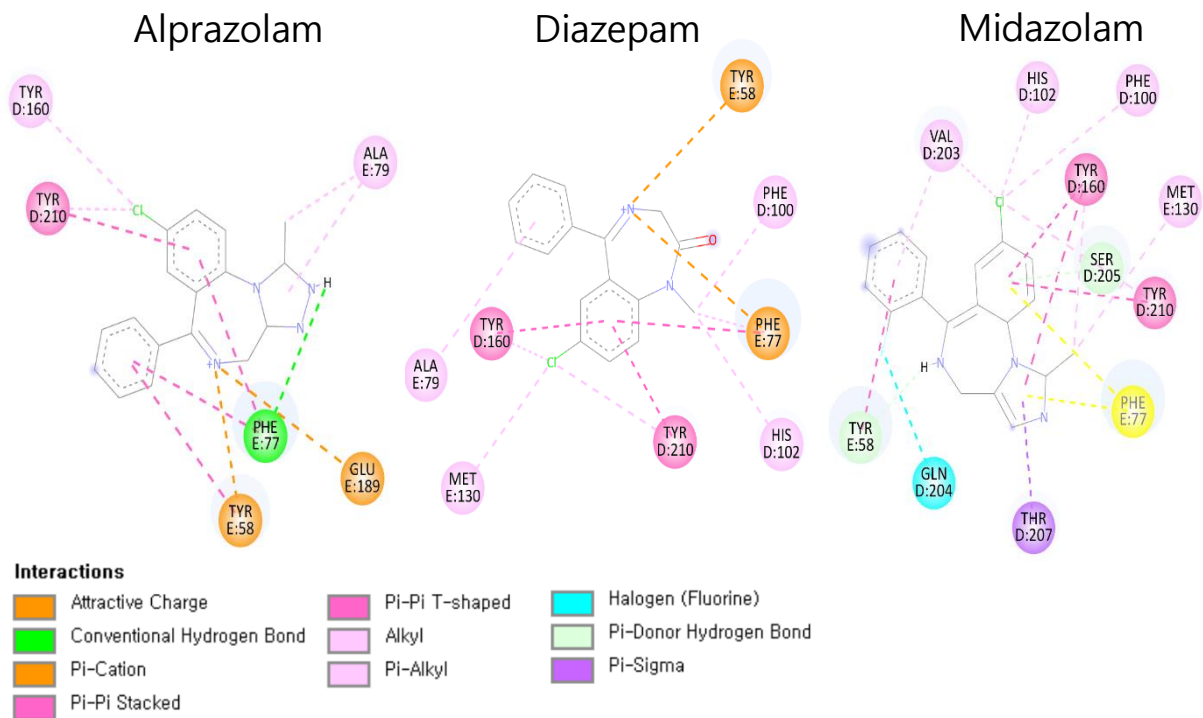


그림 2 Benzodiazepine 계열 약물의 docking simulation 모식도

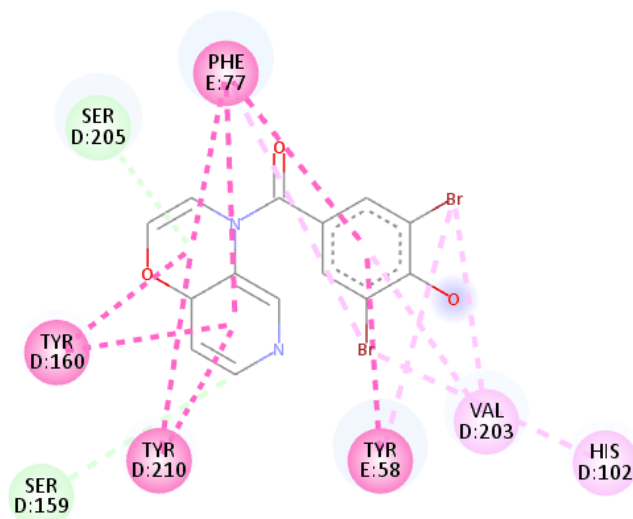


그림 3 URC102의 GABAA recptor docking simulation 모식도

그림 2는 benzodiazepine계 약물인 Alprazolam, Diazepam, Midazolam의 GABAA receptor에 대한 docking simulation 모식도 이며, 그림 3은 URC102의 GABAA receptor에 대한 docking simulation 모식도를 나타냅니다. 동일한 pocket에서 유사한 상호작용이 예상되며 key amino acid residues인 Phe77, Val203, Tyr210, Tyr160는 benzodiazepine계 약물에도 유사한 상호작용을 나타내는 key residues 입니다.

Conclusion

URC102는 2,3-dihydropyrido[4,3-b][1,4]oxazin으로 두 개의 고리가 붙어있는 구조와 벤젠고리 하나가 따로 존재하는 구조로 디아제핀 고리와 벤젠고리가 이어진 benzodiazepine계열 약물과 구조가 유사합니다. Benzodiazepine계열 약물의 타겟인 GABAA receptor에 docking simulation 한 결과, 구조 유사성에 의해 benzodiazepines와 비슷한 docking position에서 같은 amino acid residues의 상호작용이 예상되고 다른 URAT1 inhibitor에 비해 결합력이 높을 것으로 예상됩니다. 또한 URC102를 PC3, HL60, MCF7 세 가지 세포주에 처리하고 RNA sequencing을 하여 대조군에 비해 유의미하게 발현량의 변화가 생긴 DEG를 선정하였습니다. GSEA 분석을 통하여 전사체 발현이 Phase 2 metabolism과 Neuronal system에 연관됨을 알 수 있었고, 간질과 관련성이 알려진 주요 유전자들이 세포실험에서 대부분 간질 상태에서와 반대로 발현됨을 확인하였습니다. 이에 따라 URC102가 GABAA receptor에 친화력이 있으며 신경전달 관련 메커니즘에서 과전류를 방지하고 sedation 효과가 있을 것으로 예상됩니다.

[1] reactome.org

[2] Torres, Carolina Machado, et al. "NTRK2 (TrkB gene) variants and temporal lobe epilepsy: A genetic association study." *Epilepsy Research* 137 (2017): 1-8.

[3] Liu, Ai-Hua, Min Chu, and Yu-Ping Wang. "Up-regulation of Trem2 inhibits hippocampal neuronal apoptosis and alleviates oxidative stress in epilepsy via the PI3K/Akt pathway in mice." *Neuroscience Bulletin* 35 (2019): 471-485.

[4] Zhang, Hongyan, et al. "LncRNA MEG3 reduces hippocampal neuron apoptosis via the PI3K/AKT/mTOR pathway in a rat model of temporal lobe epilepsy." *Neuropsychiatric Disease and Treatment* (2020): 2519-2528.

-
- [5] Ronzano, Nadia, et al. "Phosphatase and tensin homolog (PTEN) variants and epilepsy: A multicenter case series." *Seizure* 100 (2022): 82-86.
- [6] Wu, Wei, et al. "Retinol binding protein 1-dependent activation of NF- κ B signaling enhances the malignancy of non-glioblastomatous diffuse gliomas." *Cancer Science* 113.2 (2022): 517.
- [7] Kessi, Miriam, et al. "The Contribution of HCN Channelopathies in Different Epileptic Syndromes, Mechanisms, Modulators, and Potential Treatment Targets: A Systematic Review." *Frontiers in Molecular Neuroscience* 15 (2022).
- [8] Xie, Changning, et al. "Novel HCN1 mutations associated with epilepsy and impacts on neuronal excitability." *Frontiers in Molecular Neuroscience* (2022).
- [9] Speed, Doug, et al. "A genome-wide association study and biological pathway analysis of epilepsy prognosis in a prospective cohort of newly treated epilepsy." *Human molecular genetics* 23.1 (2014): 247-258.
- [10] Rosenhahn, Erik, et al. "Bi-allelic loss-of-function variants in PPFIBP1 cause a neurodevelopmental disorder with microcephaly, epilepsy, and periventricular calcifications." *The American Journal of Human Genetics* 109.8 (2022): 1421-1435.
- [11] Carvill, Gemma L. "Calcium channel dysfunction in epilepsy: gain of CACNA1E." *Epilepsy Currents* 19.3 (2019): 199-201.