



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0105037
(43) 공개일자 2022년07월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/17 (2006.01) *A61K 31/519* (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
G01N 33/50 (2017.01) *G01N 33/574* (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 38/1709 (2020.05)
A61K 31/519 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0007589

(22) 출원일자 2021년01월19일

심사청구일자 2021년01월19일

(71) 출원인

인천대학교 산학협력단

인천광역시 연수구 아카데미로 119 (송도동)

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

윤미진

서울특별시 서초구 서운로 221, 103동 2504호(서초동, 래미안서초스위트아파트)

이미수

경기도 성남시 분당구 수내로 181, 311동 701호(분당동, 셋별마을)

(74) 대리인

특허법인이플리온

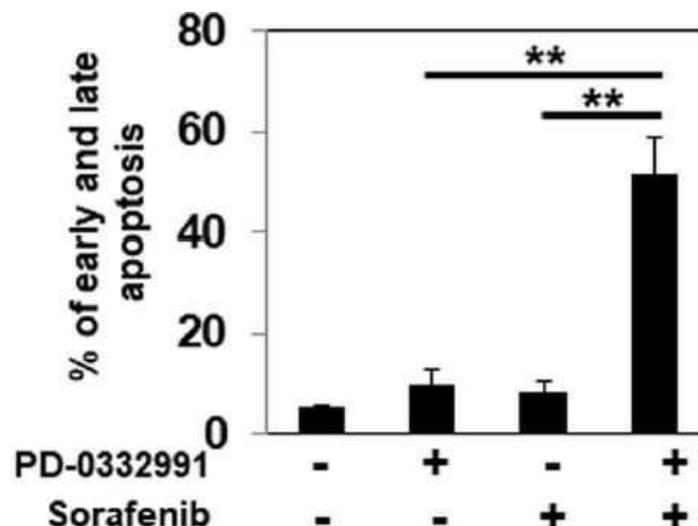
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 소라페닙의 항암효과 증진용 조성물

(57) 요약

본 발명은 암, 구체적으로는 간세포암(hepatocellular carcinoma)의 예방 또는 치료용 조성물 및 SIRT3(Sirtuin 3) 결핍 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 저분화 화합물, 특히 소라페닙에 대한 내성을 억제하고 치료 민감성을 향상시킴으로써 암환자의 생존기간을 현저히 연장할 수 있는 효율적인 병용 치료 방법으로 유용하게 이용될 수 있다. 또한, 본 발명의 SIRT3 활성화제의 스크리닝 방법은 본 발명에서 새롭게 규명된 SIRT3와 CDK4/6 간의 음의 상관관계에 기반하여 SIRT3의 발현 저하 또는 기능 이상을 원인으로 하는 다양한 질환에 대한 근원적인 치료제 후보 물질을 정확하고 신속하게 탐색할 수 있다.

대표도 - 도7e



(52) CPC특허분류

- A61P 25/28 (2018.01)
- A61P 35/00 (2018.01)
- G01N 33/5067 (2013.01)
- G01N 33/57484 (2013.01)
- G01N 33/6893 (2013.01)
- A61K 2300/00 (2013.01)
- G01N 2800/52 (2021.08)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711111873
과제번호	2018R1C1B6003894
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	신진연구자사업
연구과제명	세포 대사 재프로그래밍을 통한 항암제 내성 극복 연구
기여율	1/2
과제수행기관명	인천대학교 산학협력단
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711119125
과제번호	2016R1E1A1A01943303
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	전략공모
연구과제명	암 특이 대사를 이용한 혁신적 항암 치료 타겟 발굴
기여율	1/2
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2018.10.01 ~ 2019.07.31

명세서

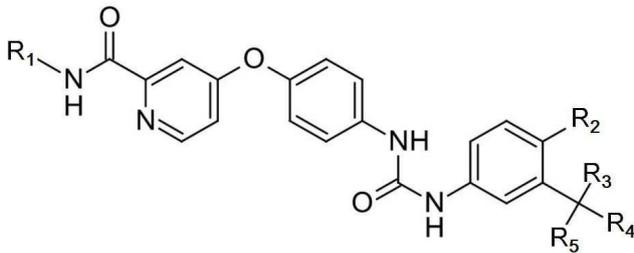
청구범위

청구항 1

(a) SIRT3(Sirtuin 3)의 활성화제; 및

(b) 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물:

화학식 1



상기 화학식 1에서, R₁은 C₁-C₃ 알킬이고, R₂는 할로겐이며, R₃ 내지 R₅는 각각 독립적으로 수소 또는 할로겐이다.

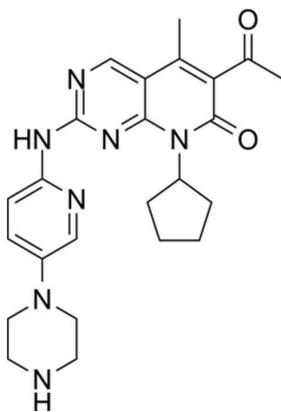
청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 SIRT3(Sirtuin 3)의 활성화제는 SIRT3 단백질, 이를 코딩하는 핵산 분자 및 CDK(cyclin-dependent kinase) 4/6 억제제로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 CDK 4/6 억제제는 하기 화학식 2로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 조성물:

화학식 2



청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 화학식 1의 R₁은 C₁ 알킬이고, R₂는 Cl인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 화학식 1의 R₃ 내지 R₅는 F인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 암은 간세포암(hepatocellular carcinoma)인 것을 특징으로 하는 조성물.

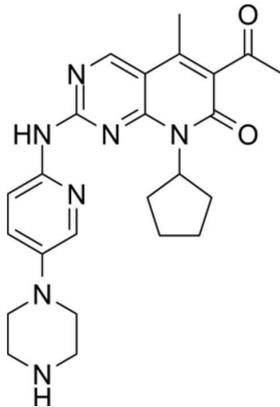
청구항 7

CDK(cyclin-dependent kinase) 4/6 억제제를 유효성분으로 포함하는 SIRT3(Sirtuin 3) 결핍 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 CDK 4/6 억제제는 하기 화학식 2로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염인 것을 특징으로 하는 조성물:

화학식 2



청구항 9

제 7 항에 있어서, 상기 SIRT3 결핍 관련 질환은 신경퇴행성 질환인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

다음의 단계를 포함하는 SIRT3(Sirtuin 3) 활성화제의 스크리닝 방법:

(a) CDK(cyclin-dependent kinase) 4/6 또는 이를 발현하는 세포를 포함하는 생물학적 시료에 후보물질을 접촉시키는 단계;

(b) 상기 시료 내 CDK 4/6의 활성 또는 발현량을 측정하는 단계,

상기 CDK 4/6의 활성 또는 발현량이 감소한 경우, 상기 후보물질은 SIRT3 활성화제로 판정한다.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 CDK 4/6를 발현하는 세포는 간 조직 유래 세포인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 12

제 10 항에 있어서, 상기 SIRT3 활성화제는 간세포암(hepatocellular carcinoma)에서의 소라페닙의 치료 반응성 증진용 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 고형암에 대한 저분화 항암제의 치료 민감성 증진용 조성물, 구체적으로는 간세포암의 소라페닙에 대한 반응성 증진용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 간세포암(HCC)은 전세계적으로 암-관련 사망의 주요 원인 중 하나이다[1]. 초기 HCC 환자는 자각 증상이 없어 대부분의 HCC는 상당 정도 진행된 후 발견되어 환자가 외과적 절제술이나 간 이식과 같은 적절한 치료를 받기가 어렵다[2].

[0004] 외과적 치료를 통해 질환의 경과가 개선되기는 하지만, 초기 HCC에서도 재발의 위험이 존재한다. 진행 HCC 환자에 대해 경구용 다중 키나아제 억제제인 소라페닙(sorafenib, Nexavar)이 1차 화학치료제로 사용되어오고 있다[3]. 소라페닙은 환자의 중앙 생존기간 3-5개월 연장함에도 불구하고, 높은 내성률과 심각한 부작용으로 인해 그 사용이 제한적이다[4-6]. 이에, 소라페닙 항암 활성을 강화시키는 전략에 대한 요구가 점차 증가하고 있다.

[0005] 시르투인(SIRT1-7)은 세포주기 진행, 세포 생존, 대사 및 혈관신생과 같은 종양 형성과정의 주요 조절자이다[7-9]. 미토콘드리아 시르투인인 SIRT3는 세포 산화 환원 균형과 산화적 손상에 대한 방어에 관여하는 몇몇 효소를 탈아세틸화하고 활성화시킨다[10-12]. 몇몇 연구는 SIRT3가 암에 있어서 이중적인 기능을 한다고 제안하였다[13-15]. SIRT3는 ROS 수준을 특정 역치 아래로 유지하여 아포토시스를 막고 세포 증식을 촉진함으로써 구강암 및 흑색종에서 종양 유전자로 기능한다[16, 17]. 반면, SIRT3는 HCC[18, 19], 유방암 [20], 난소암[21] 및 백혈병[22]에서는 종양 억제자로서 동정되었다. 나아가, SIRT3가 스트레스 상황 하에서 대사 리프로그래밍(Warburg) 및 세포사 촉발에 관여하는 것으로 보고되었다[23, 24]. 실제로, SIRT3의 고발현은 HCC 환자의 양호한 예후 및 전체 생존률 증가로 나타난다[25]. 따라서, SIRT3 발현의 조절은 종양의 개인 맞춤형 치료를 위한 새로운 전략이 될 수 있다.

[0007] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 특허문헌 1. 미국 특허공개공보 제2020-0054635호

발명의 내용

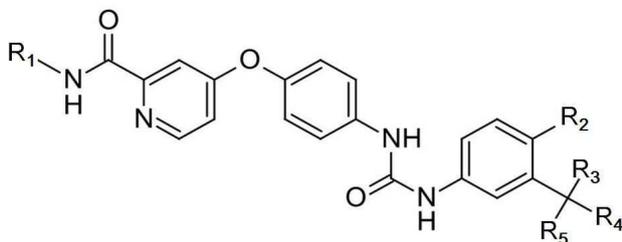
해결하려는 과제

- [0010] 본 발명자들은 고형암 환자에서 화학 치료제에 대한 내성을 극복하고 치료 반응성을 향상시킴으로써 환자의 예후와 생존률을 개선하는 방법을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, SIRT3의 발현량 또는 활성을 증가시킬 경우 하기 화학식 1로 표시되는 저분화 항암제, 구체적으로는 소라페닙(sorafenib)에 대한 치료 민감성이 유의하게 향상되어 암세포의 이동, 세포주기 진행, 증식이 현저히 저해되는 상승적(synergistic) 항암 효과가 발휘됨을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0011] 따라서, 본 발명의 목적은 암, 구체적으로는 간세포암(hepatocellular carcinoma)의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적은 SIRT3(Sirtuin 3) 결핍 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 SIRT3(Sirtuin 3) 활성화제의 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.
- [0015] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0017] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은
- [0018] (a) SIRT3(Sirtuin 3)의 활성화제; 및
- [0019] (b) 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다:

화학식 1



- [0021]
- [0022] 상기 화학식 1에서, R₁은 C₁-C₃ 알킬이고, R₂는 할로겐이며, R₃ 내지 R₅는 각각 독립적으로 수소 또는 할로겐이다.
- [0023] 본 발명자들은 고형암 환자에서 화학 치료제에 대한 내성을 극복하고 치료 반응성을 향상시킴으로써 환자의 예후와 생존률을 개선하는 방법을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, SIRT3의 발현량 또는 활성을 증가시킬 경우 상기 화학식 1로 표시되는 저분화 항암제, 구체적으로는 소라페닙(sorafenib)에 대한 치료 민감성이 유의하게 향상되어 암세포의 이동, 세포주기 진행, 증식이 현저히 저해되는 상승적(synergistic) 항암 효과가 발휘됨을 발견하였다.
- [0025] 본 명세서에서 용어 “SIRT3의 활성화제”는 SIRT3 단백질의 발현량 또는 활성을 증진시키는 유효성분을 의미하며, 예를 들어 당업계에서 이미 그 서열 및 구조가 공지된 단백질인 SIRT3의 발현을 유전자 또는 단백질 수준에서 증진시키거나 고유의 생물학적 활성을 증진시키는 핵산분자, 펩타이드, 단백질, 화합물 및 천연물을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이에, 본 발명에서 이용될 수 있는 SIRT3의 활성화제에는 SIRT3의 단백질 자체 또는 이를 인코딩하는 유전자가 탑재된 유전자 전달체와 같이 대상체 내에서 SIRT3 단백질의 수준을 직접적으로 증가시킬 수 있는 수단은 물론 이의 발현량이나 활성에 영향을 주는 유효성분이 모두 포함된다. 따라서, 용어 “SIRT3 단백질의 활성화제(activator)”는 “SIRT3 단백질 작용제(agonist)”와 동일한 의미로 사용된다.

- [0026] 본 명세서에서 용어 “알킬”은 직쇄 또는 분쇄의 포화 탄화수소기를 의미하며, 예를 들어, 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필 등을 포함한다. C₁-C₃ 알킬은 탄소수 1 내지 3의 알킬 유닛을 가지는 알킬기를 의미하며, C₁-C₃ 알킬이 치환된 경우 치환체의 탄소수는 포함되지 않은 것이다.
- [0027] 본 명세서에서 용어 “할로젠”은 할로젠족 원소를 나타내며, 예컨대, 플루오로, 클로로, 브로모 및 요오도를 포함한다.
- [0028] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 화학식 1의 R₁은 C₁ 알킬이고, R₂는 Cl이다. 보다 구체적으로는, 상기 화학식 1의 R₃ 내지 R₅는 F이다.
- [0029] R₁은 C₁ 알킬(메틸)이고, R₂는 Cl이며, R₃ 내지 R₅가 F인 화학식 1 화합물은 소라페닙(sorafenib, 4-[4-({[4-클로로-3-(트리플루오로메틸)페닐]카바모일}아미노)페녹시]-N-메틸피리딘-2-카복사마이드)이다
- [0031] 본 명세서에서 용어 “반응성(responsiveness)”은 특정 질환에 걸린 개체가 해당 질환에 대한 치료 조성물에 의해 질환의 증상이 경감, 억제, 제거 또는 완화되는 정도를 의미하며, “치료 민감성”과 동일한 의미로 사용된다. 반응성이 낮은 개체는 해당 치료제에 대해 내성 또는 저항성을 가지는 것으로 간주될 수 있다.
- [0032] 본 명세서에서 용어 “약제학적으로 허용되는 염”은 약제학적으로 허용되는 무기산, 유기산, 또는 염기로부터 유도된 염을 포함한다. 적합한 산의 예로는 염산, 브롬산, 황산, 질산, 과염소산, 푸마르산, 말레산, 인산, 글리콜산, 락트산, 살리실산, 숙신산, 툴루엔-p-설폰산, 타르타르산, 아세트산, 트리플루오초산, 시트르산, 메탄설폰산, 포름산, 벤조산, 말론산, 나프탈렌-2-설폰산, 벤젠설폰산 등을 들 수 있다. 적합한 염기로부터 유도된 염은 나트륨 등의 알칼리 금속, 마그네슘 등의 알칼리 토금속, 및 암모늄 등을 포함할 수 있다.
- [0033] 본 명세서에서 용어 “예방”은 질환 또는 질병을 보유하고 있다고 진단된 적은 없으나, 이러한 질환 또는 질병에 걸릴 가능성이 있는 대상체에서 질환 또는 질병의 발생을 억제하는 것을 의미한다.
- [0034] 본 명세서에서 용어 “치료”는 (a) 질환, 질병 또는 증상의 발전의 억제; (b) 질환, 질병 또는 증상의 경감; 또는 (c) 질환, 질병 또는 증상을 제거하는 것을 의미한다. 본 발명의 조성물을 대상체에 투여하면 TUFM에 직접적으로 결합함으로써 오토파지의 유입을 활성화하고 지질 분해를 유도하여, 과도한 지방의 축적으로 인한 대사 질환 증상의 발전을 억제하거나, 이를 제거하거나 또는 경감시키는 역할을 한다. 따라서, 본 발명의 조성물은 그 자체로 이들 질환 치료의 조성물이 될 수도 있고, 혹은 다른 약리성분과 함께 투여되어 상기 질환에 대한 치료 보조제로 적용될 수도 있다. 이에, 본 명세서에서 용어 “치료” 또는 “치료제”는 “치료 보조” 또는 “치료 보조제”의 의미를 포함한다.
- [0035] 본 명세서에서 용어 “투여” 또는 “투여하다”는 본 발명의 조성물의 치료적 유효량을 대상체에 직접적으로 투여함으로써 대상체의 체내에서 동일한 양이 형성되도록 하는 것을 말한다.
- [0036] 본 발명에서 용어 “치료적 유효량”은 본 발명의 약제학적 조성물을 투여하고자 하는 개체에게 조성물 내의 약리성분이 치료적 또는 예방적 효과를 제공하기에 충분한 정도로 함유된 조성물의 함량을 의미하며, 이에 “예방적 유효량”을 포함하는 의미이다.
- [0037] 본 명세서에서 용어 “대상체”는 제한없이 인간, 마우스, 래트, 기니아 피그, 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 원숭이, 침팬지, 비비 또는 붉은털 원숭이를 포함한다. 구체적으로는, 본 발명의 대상체는 인간이다.
- [0038] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 SIRT3(Sirtuin 3)의 활성화제는 SIRT3 단백질, 이를 코딩하는 핵산 분자 및 CDK(cyclin-dependent kinase) 4/6 억제제로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0039] 후술하는 실시예에서 보는 바와 같이, 본 발명자들은 SIRT3의 발현량과 망막아세포중 단백질(Rb)의 인산화 간의 음의 상관관계를 관찰하였으며, CDK4/6와 SIRT3 발현 역시 음의 상관관계를 가짐을 최초로 규명함으로써 CDK4/6의 억제를 통해 SIRT3의 발현을 증가시킬 수 있음을 발견하였다.
- [0040] 본 명세서에서 용어 “CDK 4/6 억제제”는 CDK 4 및/또는 CDK6 효소의 활성 또는 발현의 저하를 야기시키는 물질을 의미하며, 이에 의해 CDK 4 및/또는 CDK6의 활성 또는 발현이 탐지 불가능해지거나 무의미한 수준으로 존재하게 되는 경우 뿐 아니라, 이에 의해 SIRT3 발현이 유의하게 증가할 수 있을 정도로 CDK 4 및/또는 CDK6의 활성 또는 발현을 감소시키는 물질을 의미한다.

- [0041] 본 명세서에서 용어 “발현의 감소”는 CDK 4/6의 발현량이 예를 들어 대조군에 비하여 20% 이상 감소한 상태, 보다 구체적으로는 30% 이상 감소한 상태, 보다 더 구체적으로는 40% 이상 감소한 상태를 의미할 수 있다.
- [0042] 본 명세서에서 용어 “활성의 감소”란 대조군에 비하여 CDK 4/6의 생체내 고유한 키나아제 활성이 측정 가능할 정도로 유의하게 감소하는 것을 말하며, 예를 들어 대조군에 비하여 20% 이상 감소한 상태, 보다 구체적으로는 30% 이상 감소한 상태, 보다 더 구체적으로는 40% 이상 감소한 상태를 의미할 수 있다. 활성(activity)의 감소는 단순한 기능(function)의 감소 뿐 아니라 안정성(stability)의 감소로 기인한 궁극적인 활성 저해를 포함한다.
- [0043] CDK 4/6의 억제제는 예를 들어 당업계에 이미 그 아미노산 서열 및 인코딩 뉴클레오타이드 서열이 공지된 CDK 4/6 효소의 발현을 유전자 수준에서 억제하는 shRNA, siRNA, miRNA, 리보자임(ribozyme), PNA(peptide nucleic acids), 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 타겟 유전자를 인식하는 가이드 RNA를 포함하는 CRISPR 시스템과, 단백질 수준에서 억제하는 항체 또는 앵타머 뿐 아니라, 이들의 활성을 억제하는 저분자 화합물, 펩타이드 및 천연물을 포함하나, 이에 제한되지 않고 유전자 및 단백질 수준에서의 가능한 모든 억제수단이 사용될 수 있다.
- [0044] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 CDK 4/6 억제제는 CDK 4/6의 발현 또는 활성을 단백질 수준에서 저해하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편일 수 있다. CDK 4/6를 특이적으로 인식하는 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체이며, 바람직하게는 모노클로날 항체이다.
- [0045] 본 발명의 항체는 당업계에서 통상적으로 실시되는 방법들, 예를 들어, 융합 방법(Kohler and Milstein, *European Journal of Immunology*, 6:511-519 (1976)), 제조할 DNA 방법(미국 특허 제4,816,567호) 또는 파아지 항체 라이브러리 방법(Clackson et al, *Nature*, 352:624-628(1991) 및 Marks et al, *J. Mol. Biol.*, 222:58, 1-597(1991))에 의해 제조될 수 있다. 항체 제조에 대한 일반적인 과정은 Harlow, E. and Lane, D., *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, New York, 1999; 및 Zola, H., *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1984에 상세하게 기재되어 있다.
- [0046] 본 명세서에서 용어 “항원 결합 단편(antigen binding fragment)”은 면역글로불린 전체 구조 중 항원이 결합할 수 있는 폴리펩티드의 일부를 의미하며, 예를 들어 F(ab')₂, Fab', Fab, Fv 및 scFv를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0047] 본 명세서에서 용어, “특이적으로 결합(specifically binding)”은 “특이적으로 인식(specifically recognizing)”과 동일한 의미로서, 항원과 항체(또는 이의 단편)가 면역학적 반응을 통해 특이적으로 상호작용하는 것을 의미한다.
- [0048] 본 발명은 항체 대신 CDK 4/6에 특이적으로 결합하는 앵타머를 이용하여 이의 활성을 단백질 수준에서 억제할 수도 있다. 본 명세서에서 용어 “앵타머”는 특정 표적물질에 높은 친화력과 특이성으로 결합하는 단일 줄기의 (single-stranded) 핵산(RNA 또는 DNA) 분자 또는 펩타이드 분자를 의미한다. 앵타머의 일반적인 내용은 Hoppe-Seyler F, Butz K "Peptide aptamers: powerful new tools for molecular medicine". *J Mol Med*. 78(8):426-30(2000); Cohen BA, Colas P, Brent R . "An artificial cell-cycle inhibitor isolated from a combinatorial library". *Proc Natl Acad Sci USA*. 95(24):14272-7(1998)에 상세하게 개시되어 있다.
- [0050] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 CDK 4/6 억제제는 CDK 4/6 효소를 인코딩하는 뉴클레오타이드의 발현을 억제하는 핵산 분자일 수 있다.
- [0051] 본 명세서에서 용어 “핵산 분자”는 DNA(gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 가지며, 핵산 분자에서 기본 구성 단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체 (analogue)도 포함한다(Scheit, *Nucleotide Analogs*, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, *Chemical Reviews*, 90:543-584(1990)).
- [0052] 본 명세서에서 용어 “발현을 억제하는 핵산 분자”는 표적 유전자와 혼성화될 수 있는 상보적인 핵산 서열을 포함함으로써 표적 유전자를 특이적으로 인식하고, 이의 기능 저하를 야기하는 뉴클레오타이드 구조 상의 변형을 야기할 수 있는 핵산 분자를 의미하며, 예를 들어 상술한 shRNA, siRNA, miRNA, 리보자임, PNA, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, CRISPR 시스템에 포함된 gRNA를 포함한다.
- [0053] 본 명세서에서 용어 “상보적”은 소정의 어닐링 또는 혼성화 조건 하에서 발현 억제용 핵산 분자가 타겟 핵산

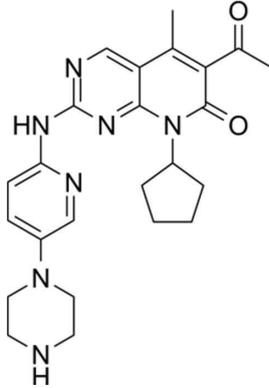
서열에 선택적으로 혼성화할 정도로 충분히 상보적인 것을 의미하며, 실질적으로 상보적(substantially complementary) 및 완전히 상보적(perfectly complementary)인 것을 모두 포괄하는 의미를 가지고, 바람직하게는 완전히 상보적인 것을 의미한다. 본 명세서에서 용어 “실질적으로 상보적인 서열”은 완전히 일치되는 서열 뿐만 아니라, 특정 서열에 어닐링하여 서열 특이적인 혼성화가 일어날 수 있는 범위 내에서, 비교 대상의 서열과 부분적으로 불일치되는 서열도 포함되는 의미이다.

- [0054] 본 명세서에서 용어 “shRNA(small hairpin RNA)”는 인 *비보* 상에서 스템-루프(stem-loop) 구조를 이루는 단일 가닥으로 50-70개로 구성된 뉴클레오타이드로서, RNA 간섭을 통해 타겟 유전자의 발현을 억제하기 위한 타이트한 헤어핀 구조를 만드는 RNA 서열을 의미한다. 통상적으로 5-10개의 뉴클레오타이드의 루프 부위 양쪽으로 상보적으로 19-29개의 뉴클레오타이드의 긴 RNA가 염기쌍을 이루어 이중가닥의 스템을 형성하며, 언제나 발현되도록 하기 위하여 U6 프로모터를 포함하는 벡터를 통해 세포 내로 형질도입되며 대개 딸세포로 전달되어 타겟 유전자의 발현억제가 유전되도록 한다.
- [0055] 본 명세서에서 용어 “siRNA”는 특정 mRNA의 절단(cleavage)을 통하여 RNAi(RNA interference) 현상을 유도할 수 있는 짧은 이중사슬 RNA를 의미한다. 타겟 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성된다. 전체 길이는 10 내지 100 염기, 바람직하게는 15 내지 80 염기, 가장 바람직하게는 20 내지 70 염기이고, 타겟 유전자의 발현을 RNAi 효과에 의하여 억제할 수 있는 것이면 평활(blunt)말단 혹은 집착(cohesive) 말단 모두 가능하다. 집착 말단 구조는 3 말단 돌출한 구조와 5 말단 쪽이 돌출한 구조 모두 가능하다.
- [0056] 본 명세서에서 용어 “miRNA(microRNA)”는 세포내에서 발현되지 않는 올리고뉴클레오타이드로서 짧은 스템-루프 구조를 가지면서 타겟 유전자의 mRNA와 상보적인 결합을 통하여 타겟 유전자 발현을 억제하는 단일 가닥 RNA 분자를 의미한다.
- [0057] 본 명세서에서 용어 “리보자임(ribozyme)”은 RNA의 일종으로 특정한 RNA의 염기 서열을 인식하여 자체적으로 이를 절단하는 효소와 같은 기능을 가진 RNA 분자를 의미한다. 리보자임은 타겟 mRNA 가닥의 상보적인 염기서열로 특이성을 가지고 결합하는 영역과 타겟 RNA를 절단하는 영역으로 구성된다.
- [0058] 본 명세서에서 용어 “PNA(Peptide nucleic acid)”는 핵산과 단백질의 성질을 모두 가지면서 DNA 또는 RNA와 상보적으로 결합이 가능한 분자를 의미한다. PNA는 자연계에서는 발견되지 않고 인공적으로 화학적인 방법으로 합성되며, 상보적인 염기 서열의 천연 핵산과 혼성화(hybridization)를 통해 이중가닥을 형성하여 타겟 유전자의 발현을 조절한다.
- [0059] 본 명세서에서 용어 “안티센스 올리고뉴클레오타이드”는 특정 mRNA의 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열로서 타겟 mRNA 내의 상보적 서열에 결합하여 이의 단백질로의 번역, 세포질내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해하는 핵산 분자를 의미한다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 효능을 증진시키기 위하여 하나 이상의 염기, 당 또는 골격(backbone)의 위치에서 변형될 수 있다(De Mesmaeker et al., *Curr Opin Struct Biol.*, 5(3):343-55, 1995). 올리고뉴클레오타이드 골격은 포스포로티오에이트, 포스포트리에스테르, 메틸 포스포네이트, 단쇄 알킬, 시클로알킬, 단쇄 헤테로아토믹, 헤테로시클릭 당솔포네이 등으로 변형될 수 있다.
- [0060] 본 명세서에서 용어 “gRNA(guideRNA)”는 타겟 유전자를 인식하여 핵산분해효소(nuclease)를 유도함으로써 인식된 분위를 특이적으로 절단하는 유전자 편집 시스템에 사용되는 RNA 분자를 의미한다. 이러한 유전자 편집 시스템에는 대표적으로 CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) 시스템이 있다.
- [0061] 상술한 본 발명의 핵산 분자는 대상체 내에서 발현시킴으로써 CDK 4/6의 발현을 유전자 수준에서 억제할 수 있다.
- [0062] 본 명세서에서 용어 “발현시키다”는 대상체가 외래(exogenous) 유전자를 발현하게 하거나 또는 내인성(endogenous) 유전자의 자연적 발현량을 증가시키기 위해 유전자 전달체를 이용하여 인위적으로 이를 도입함으로써 유전자가 대상체 세포 내에서 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합 완성에 의해 복제 가능하게 되는 것을 의미한다. 따라서, 용어 “발현”은 “형질전환(transformation)”, “형질감염(transfection)” 또는 “형질도입(transduction)”과 동일한 의미이다.
- [0063] 본 명세서에서, 용어 “유전자 전달 시스템(gene delivery system)”은 유전자를 세포 내로 운반하는 모든 수단을 의미하며, 유전자 전달은 유전자의 세포내 침투(transduction)와 동일한 의미를 가진다. 조직 수준에서, 상기 용어 유전자 전달은 유전자의 확산(spread)과 동일한 의미를 가진다. 따라서, 본 발명의 유전자 전달 시

시스템은 유전자 침투 시스템 및 유전자 확산 시스템으로 기재될 수 있다.

[0065] 보다 구체적으로는, 상기 CDK 4/6 억제제는 하기 화학식 2로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이다:

[0066] **화학식 2**



[0067]

[0068] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물로 예방 또는 치료되는 암은 간세포암(hepatocellular carcinoma)이다.

[0070] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 CDK(cyclin-dependent kinase) 4/6 억제제를 유효성분으로 포함하는 SIRT3(Sirtuin 3) 결핍 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0071] 본 발명에서 이용되는 CDK 4/6 억제제에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과반 중복을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.

[0072] 본 명세서에서 용어 “SIRT3 결핍 관련 질환”은 SIRT3의 발현 저하 또는 기능 부전을 원인으로 하는 질환을 의미한다. 미토콘드리아 내에 존재하는 1차적인 NAD 의존적 디아세틸화 효소인 SIRT3는 활성 산소의 독성을 제거하고 지방산의 베타 산화를 통한 제거를 촉매함으로써 산화 스트레스, 미토콘드리아 기능 및 대사를 조절하는데 핵심적인 역할을 하며, 이의 결핍은 뇌에서의 신경 퇴행을 가속화하는 것으로 알려져 있다. 이에, 본 발명의 조성물로 예방 또는 치료될 수 있는 SIRT3 결핍 관련 질환은 미토콘드리아 기능이상 관련 질환이며, 구체적으로는 신경퇴행성 질환이고, 보다 구체적으로는 알츠하이머병(Alzheimer’s disease), 파킨슨병(Parkinson’s disease), 근위축성 측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 헌팅턴병(Huntington’s disease), 크로이츠펠트-야콥병(Creutzfeldt-Jakob disease), 루이소체 치매(Lewy body dementia), 아밀로이드 뇌혈관병증(cerebral amyloid angiopathy), 픽병(Pick’s disease) 및 다발성 경화증(multiple sclerosis)을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0074] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 SIRT3(Sirtuin 3) 활성화제의 스크리닝 방법을 제공한다:

[0075] (a) CDK(cyclin-dependent kinase) 4/6 또는 이를 발현하는 세포를 포함하는 생물학적 시료에 후보물질을 접촉시키는 단계;

[0076] (b) 상기 시료 내 CDK 4/6의 활성 또는 발현량을 측정하는 단계,

[0077] 상기 CDK 4/6의 활성 또는 발현량이 감소한 경우, 상기 후보물질은 SIRT3 활성화제로 판정한다.

[0078] 본 발명에서 용어 “생물학적 시료”는 인간을 포함한 포유동물로부터 얻어지는, CDK 4/6 또는 이를 발현하는 세포를 포함하고 있는 모든 시료로서, 조직, 기관, 세포 또는 세포 배양액을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0079] 본 발명의 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어 “후보물질”은 CDK 4/6 또는 이를 발현하는 세포를 포함하는 시료에 첨가되어 CDK 4/6의 활성 또는 발현량에 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이

용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 시험물질은 화합물, 뉴클레오타이드, 펩타이드 및 천연 추출물을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 시험물질을 처리한 생물학적 시료에서 CDK 4/6의 발현량 또는 활성을 측정하는 단계는 당업계에 공지된 다양한 발현량 및 활성 측정방법에 의해 수행될 수 있다. 측정 결과, CDK 4/6의 발현량 또는 활성이 감소한 경우 상기 시험물질은 SIRT3의 활성화제로 판정될 수 있다.

[0081] 본 발명에 따르면, 본 발명의 스크리닝 타겟인 CDK 4/6 효소의 발현 수준은 항원-항체 반응을 이용한 면역분석(immunoassay) 방법에 따라 측정할 수 있다. 이러한 면역분석은 종래에 개발된 다양한 면역분석 또는 면역염색 프로토콜에 따라 실시될 수 있다.

[0082] CDK 4/6 효소의 발현 수준은 CDK 4/6 효소를 인코딩하는 유전자의 발현량을 측정하는 체제를 이용하여 유전자 수준에서 측정될 수도 있다. 상기 유전자의 발현량을 측정하는 체제는 예를 들어 CDK 4/6 유전자의 핵산 서열에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브이다.

[0083] 본 명세서에서 사용되는 용어 “프라이머”는 핵산쇄(주형)에 상보적인 프라이머 연장 산물의 합성이 유도되는 조건, 즉, 뉴클레오타이드와 DNA 중합효소와 같은 중합제의 존재, 적합한 온도와 pH의 조건에서 합성의 개시점으로 작용하는 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 구체적으로는, 프라이머는 디옥시리보뉴클레오타이드 단일쇄이다. 본 발명에서 이용되는 프라이머는 자연(naturally occurring) dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 변형 뉴클레오타이드 또는 비-자연 뉴클레오타이드를 포함할 수 있으며, 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다.

[0084] 본 발명에서 용어 “상보적”은 소정의 어닐링 또는 혼성화 조건하에서 프라이머 또는 프로브가 타겟 핵산 서열에 선택적으로 혼성화할 정도로 충분히 상보적인 것을 의미하며, 실질적으로 상보적(substantially complementary)인 경우 및 완전히 상보적(perfectly complementary)인 경우를 모두 포괄하는 의미이며, 구체적으로는 완전히 상보적인 경우를 의미한다. 본 명세서에서 용어 “실질적으로 상보적인 서열”은 완전히 일치되는 서열뿐만 아니라, 특정 서열에 어닐링하여 프라이머 역할을 할 수 있는 범위 내에서, 비교 대상의 서열과 부분적으로 불일치되는 서열도 포함되는 의미이다.

[0085] 본 명세서에서 용어 “프로브”는 특정 뉴클레오타이드 서열에 혼성화될 수 있는 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하는 자연 또는 변형되는 모노머 또는 결합을 갖는 선형의 올리고머를 의미한다. 구체적으로, 프로브는 혼성화에서의 최대 효율을 위하여 단일가닥이며, 더욱 구체적으로는 디옥시리보뉴클레오타이드이다.

[0087] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 CDK 4/6를 발현하는 세포는 간 조직 유래 세포이다.

[0088] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 SIRT3 활성화제는 간세포암(hepatocellular carcinoma)에서의 소라페닙의 치료 반응성 증진용 조성물이다.

발명의 효과

[0090] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0091] (a) 본 발명은 암, 구체적으로는 간세포암(hepatocellular carcinoma)의 예방 또는 치료용 조성물 및 SIRT3(Sirtuin 3) 결핍 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0092] (b) 본 발명은 저분화 화합물, 특히 소라페닙에 대한 내성을 억제하고 치료 민감성을 향상시킴으로써 암환자의 생존기간을 현저히 연장할 수 있는 효율적인 병용 치료 방법으로 유용하게 이용될 수 있다.

[0093] (c) 또한 본 발명의 SIRT3 활성화제의 스크리닝 방법은 본 발명자들에 의해 새롭게 규명된 SIRT3와 CDK4/6 간의 음의 상관관계에 기반하여 SIRT3의 발현 저하 또는 기능 이상을 원인으로 하는 다양한 질환에 대한 근원적인 치료제 후보 물질을 정확하고 신속하게 탐색할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0095]

도 1은 간세포암(HCC) 환자에서 ¹⁸F-FDG 흡수에 따른 SIRT3 발현 양상을 보여주는 그림이다. 도 1a는 접형골경 유수술 후 수득한 동결 HCC 시료에서 추출한 RNA에 대해 SIRT3 특이적 프로브를 이용하여 RT-PCR을 수행한 결과이다. 타겟 유전자의 발현은 2- $\Delta\Delta$ Ct 방법을 이용하여 B2M(하우스키핑 유전자)에 대해 정규화하였다. 0에 가까운 박스의 경계는 25%를, 박스 내 선은 중앙값을, 0에서 가장 먼 박스의 경계선은 75%를 각각 나타낸다. 도 1b는 포르말린 고정된, 파라핀-포매 인간 HCC 시료에 대한 면역형광 및 DAPI 대조 염색 결과를 나타낸다. 스케일바: 50 μ m. 통계적 분석은 GraphPad Prism을 이용하여 수행하였다. 결과는 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. 그룹 간 비교는 맨-휘트니 검정을 이용하여 수행하였다. *P<0.05

도 2는 간세포암(HCC) 세포주 및 HCC 이식 모델에서의 SIRT3 발현을 보여주는 그림이다. 도 2a는 4개의 상이한 HCC 세포주에서의 SIRT3 발현을 정량적 RT-PCR로 측정된 결과이다. 타겟 유전자의 발현 수준은 하우스키핑 유전자인 B2M에 대해 정규화하였다. 데이터는 3회의 독립 실험에 대한 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. 도 2b는 HCC 세포주에서 SIRT3 및 액틴에 대한 항체를 이용한 웨스턴 블롯팅 결과이다. 도 2c는 HCC 이식 모델에서 수득한 포르말린 고정된, 파라핀-포매된 간조직에 대해 SIRT3, GLUT1 및 Ki67 항체를 이용하여 면역조직화학분석을 수행한 결과를 나타낸다. 스케일바: 20 μ m. 도 2d는 Huh7 세포를 MOCK 벡터 및 pcDNA-SIRT3로 형질도입하고 48시간 배양 후, 단백질을 추출하여 웨스턴 블롯팅으로 SIRT3, Ki67 및 액틴 발현을 측정된 결과이다. 도 2e는 Glucose-Glo 어세이를 이용하여 글루코스 흡수를 측정된 결과를 나타낸다. 데이터는 3회의 독립 실험에 대한 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. 통계적 분석은 GraphPad Prism을 이용하여 수행하였으며, 그룹 간 비교는 맨-휘트니 검정을 이용하여 수행하였다. *P < 0.01.

도 3은 SIRT3 발현 수준과 소라페닙 처리 간의 관계를 보여주는 그림이다. 도 3a는 간세포암(HCC) 세포에 소라페닙을 처리하자 SIRT3 발현이 감소됨을 보여준다. HCC 세포를 DMSO, 1 μ M 소라페닙 또는 10 μ M 소라페닙과 배양하였다. 48시간 뒤, SIRT3 및 액틴 수준을 웨스턴 블롯팅으로 측정하였다. 도 3b는 Huh7 세포를 MOCK 또는 pcDNA-SIRT3으로 형질도입 후 24시간 뒤 10 μ M 소라페닙을 처리하고 24시간 배양 후 웨스턴 블롯팅으로 SIRT3 및 β -액틴 발현을 측정된 결과를 나타낸다. 도 3c는 WST-1 어세이로 세포 증식을 측정된 결과를 나타낸다. 데이터는 3회의 독립 실험에 대한 평균 \pm 표준편차로 표시하였다. 도 3d는 SIRT3 KD 또는 대조군 세포주를 지시된 농도의 소라페닙과 배양 후 48시간 뒤 WST-1 어세이로 세포 증식을 측정된 결과를 보여주는 그림이다. 통계적 분석은 GraphPad Prism을 이용하여 수행하였다. 결과는 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. 그룹 간 비교는 맨-휘트니 검정을 이용하여 수행하였다. *P < 0.05; **P < 0.01

도 4는 SIRT3 및 망막아세포종 단백질(Rb) 간의 음의 상관관계를 나타낸 그림이다. 도 4a는 HCC 이식 모델의 포르말린 고정된, 파라핀-포매(FFPE) 간조직에 대해 phosphor-Rb(pRb)에 대한 항체로 면역조직화학분석을 수행하고 헤마톡실린으로 대비염색한 결과는 나타낸다. 스케일바: 50 μ m. 도 4b는 접형골경유수술 후 동결된 HCC 시료로부터 RNA를 추출하고 Rb에 특이적인 프로브를 이용한 RT-PCR 수행 결과를 보여주는 그림이다. 타겟 유전자의 발현은 B2M(하우스키핑 유전자)에 대해 정규화하였다. 0에 가까운 박스의 경계는 25%를, 박스 내 선은 중앙값을, 0에서 가장 먼 박스의 경계선은 75%를 각각 나타낸다. *P<0.05. 도 4c는 인간 HCC 환자의 FFPE 간조직에 대해 SIRT3(좌) 및 pRb(우) 항체를 이용하여 면역조직화학 분석을 수행하고 헤마톡실린으로 대비염색한 결과는 나타낸다. 스케일바: 50 μ m

도 5는 PD0332991 처리에 의해 SIRT3가 유도됨을 보여주는 그림이다. 도 5a는 HepG2, Hep3B, SK-Hep1 및 Huh7 세포를 DMSO, 1 μ M PD0332991 또는 10 μ M PD0332991와 함께 배양한 뒤 48시간 후 SIRT3 및 액틴 수준을 웨스턴 블롯팅으로 측정된 결과는 나타낸다. HepG2 세포, Huh7 세포, SK-Hep1 세포를 스크램블 siRNA 또는 CDK4/6에 대한 siRNA로 형질도입 후 48시간 뒤 웨스턴 블롯팅을 수행하였다(도 5b). 도 5c는 HepG2 세포를 스크램블 siRNA 또는 CDK4/6에 대한 siRNA로 형질도입 후 유전자 발현 프로파일링을 통해 도출된 유전자 배수 변화를 나타내는 그림이다. 모든 데이터는 GEO 데이터베이스에 접근번호 GSE145389로 업로드되었다.

도 6은 소라페닙과 PD0332991의 병용 투여에 의해 소라페닙에 대한 민감성이 증가하였음을 보여주는 그림이다. HepG2 세포를 DMSO 또는 10 μ M PD0332991와 함께 1 μ M 소라페닙의 존재 또는 부재 하에 배양하고, 48시간 뒤에 qRT-PCR로 SIRT3 수준을 분석하였다(도 6a). 타겟 유전자의 발현 수준을 하우스키핑 유전자인 B2M에 대해 정규화하였다. 데이터는 3회의 독립 실험에 대한 평균 \pm 표준편차로 표시하였다. 동일한 방법으로 세포를 처리하고 단백질을 추출 후 SIRT3 및 액틴의 발현을 웨스턴 블롯팅으로 측정하였다(도 6b). 도 6c는 WST-1 어세이를 이용하여 48시간 뒤 증식을 분석한 결과를 나타낸다. Huh7 세포를 DMSO 또는 10 μ M PD0332991와 함께 1 μ M 소라페닙의 존재 또는 부재 하에 배양하고, 48시간 뒤 단백질을 추출하고 SIRT3 및 액틴의 발현을 웨스턴 블롯팅으로 측정하였다(도 6d). 도 6e는 WST-1 어세이를 이용하여 48시간 뒤 증식을 분석한 결과를 나타낸다. 결

과는 6회의 반복 실험 데이터에 대한 평균 ± 표준편차로 나타내었다.

도 7은 HepG2 세포 및 Huh7 세포에서 소라페닙과 PD0332991를 병용 처리하자 성장 억제가 강화됨을 보여주는 그림이다. 도 7a는 이동 어세 결과를 보여주는 그림이다. 지정된 약물을 처리한 뒤 24시간 후 HepG2 세포 및 Huh7 세포를 고정시키고 크리스탈 바이올렛 염색으로 시각화하였다. 도 7b 및 7c는 매트릭젤-코팅된 필터에서의 세포 이동에 대한 정량적 분석결과를 보여주는 그림이다. x 200 배율로 5개의 무작위 필드에서 계수하였다. 도 7d 및 7e는 지시된 약물 처리 후 24시간 뒤 HepG2 및 Huh7 세포에 대한 아넥신 V-APC/프로피듐 아이오다이드 (PI) 이중 염색을 하여 아포토시스를 분석한 결과를 보여주는 그림이다. 2색 유세포 도트 플롯을 통해 아넥신 V 및 PI 모두 음성인 살아있는 세포; 아넥신 V에 양성이고 PI에 음성인 초기 사멸 세포; 및 이중-양성인 말기 세포사멸/괴사 세포의 각 비율을 나타내었다. 결과는 평균 ± 표준편차로 나타내었다(n=3). 통계적 분석은 GraphPad Prism을 이용하여 수행하였다. 결과는 평균 ± 표준오차(범위)로 나타내었다. 그룹 간 비교는 맨-휘트니 검정을 이용하여 수행하였다. *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001

도 8은 HCC 환자에서의 ¹⁸F-FDG 흡수에 따른 SIRT3 발현을 측정된 결과를 웨스턴 블롯팅(도 8a) 및 Image J를 통한 밴드 정량(도 8b)를 통해 나타낸 그림이다. 통계적 분석은 GraphPad Prism을 이용하여 수행하였다. 결과는 평균 ± 표준편차로 나타내었다. 그룹 간 비교는 맨-휘트니 검정을 이용하여 수행하였다. *P < 0.05.

도 9는 소라페닙과 PD0332991의 상승적인 항종양 효과를 보여주는 그림이다. 도 9a는 HepG2 및 Huh7 세포에서 소라페닙과 PD0332991의 병용투여 후 세포주기를 분석한 결과이다. 도 9b는 HepG2 및 Huh7 세포에 소라페닙과 PD0332991를 병용투여 후 Ki67로 면역형광염색 후 DAPI로 대조염색한 결과이다. 도 9c는 Ki67 양성 세포의 계수 결과이며, 도 9d는 아넥신 V-APC/프로피듐 이오다이드(PI) 이중 염색을 통해 HepG2 및 Huh7 세포의 아포토시스를 측정된 결과를 보여주는 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0096] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0098] 실시예

[0099] 실험방법

[0100] 인간 HCC 시료

[0101] 본 발명의 연구는 연세대학교 세브란스 병원의 임상연구윤리위원회의 승인 하에 진행되었으며, 실험은 현행 연구윤리 가이드라인(Yonsei IRB number: 4-2015-0904)을 준수하면서 수행하였다. 종래에 보고된 방법으로 환자를 선정하였다[26].

[0103] 화합물

[0104] PD0332991은 TOCRIS Bioscience(Bristol, UK)에서, 소라페닙은 Santa Cruz(Dallas, TX, USA)에서 구입하였다. PD0332991 및 소라페닙을 10 mM 농도로 DMSO(Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)에 용해시켰다. 모든 시약은 -80℃에 저장하였다.

[0106] 세포주 및 세포 배양

[0107] 인간 HCC 세포주 HepG2, Hep3B, skHep1 및 Huh7는 한국 세포주 은행에서 구입하였으며, HepG2는 RPMI에서, Hep3B, skHep1 및 Huh7은 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)에서 배양하였다. 모든 배양 배지에 10% 우태아혈청(FBS; Hyclone) 및 1% 페니실린 스트렙토마이신을 첨가하였다. 세포는 가습 인큐베이터에서 5% CO₂ 및 37℃로 유지하였다. 3차원 스페로이드 형성을 위해, Costar® Ultra-Low attachment 다중-웰 플레이트 (MerkKGaA→Corning, Darmstadt, Germany)를 사용하였다. HCC 세포를 5000 세포/well로 플레이팅하고 179 x g 로 1분 간 원심분리하였다. 플레이팅 1-2일 뒤 스페로이드가 관찰되었다. Hep3B, skHep1 및 Huh7 세포주를 플

레이팅하고 형질도입 전 24시간 동안 배양하였다. 리포펙타민 또는 RNAi-MAX 시약(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 제조사의 설명서에 따라 siRNA 형질도입을 수행하였다. hSIRT3 플라스미드(sc-61, 555-SH) 또는 스크램블 shRNA 플라스미드(sc-108,060)를 리포펙타민 2000 (Invitrogen, 12,566,014)을 이용하여 공-형질주입하였다. 72시간 배양 후 세포에 푸로마이신(2 µg/mL)을 처리하여 안정적인 세포주 클론을 형성하였다.

[0109] 세포 증식 어세이 및 글루코스 측정

[0110] 세포 생존률 측정을 위한 WST-1 비색(colorimetric) 어세이(Roche, Mannheim, Germany)를 48시간 뒤 제조사의 설명서에 따라 수행하였다. Huh7 세포를 96-웰 플레이트에 넣고 MOCK 또는 pcDNA-SIRT3 플라스미드로 형질주입하였다. 48시간의 처리 후, 글루코스 어세이(Promega, Germany)를 이용하여 제조사의 설명서에 따라 글루코스 흡수를 측정하였다. 마이크로 플레이트 리더(Molecular Devices, CA, USA)를 이용하여 440 nm 및 640 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

[0112] RNA 분리 및 시퀀싱

[0113] TRIzol 시약(Invitrogen)을 이용하여 총 RNA를 분리하였다. RNA 품질은 RNA 6000 Nano Chip(Agilent Technologies, Amstelveen, The Netherlands)을 이용하여 Agilent 2100 bioanalyzer로 평가하였으며, ND-2000 분광 광도계(Thermo Inc., DE, USA)로 RNA를 정량하였다. 대조군 및 시험 RNA 시료를 위해, QuantSeq 3' mRNA-Seq 라이브러리 Prep Kit (Lexogen, Inc., Austria)을 이용하여 제조사의 설명서에 따라 라이브러리를 구축하였다. 요약하면, 각 시료에 대해 500ng의 총 RNA를 제작하고, 5' 말단에 일루미나 호환 서열을 포함하는 oligo-dT 프라이머를 RNA에 혼성화시킨 후 역전사를 수행하였다. RNA 주형 분해 후, 5' 말단에 일루미나 호환-링커 서열을 포함하는 무작위 프라이머로 2차 가닥 합성을 개시하였다. 자성 비드로 2중 가닥 라이브러리를 정제하여 모든 반응 조성물을 제거하였다. 라이브러리를 증폭하여 클러스터 형성에 필요한 완성 어댑터 서열을 추가하였다. 증폭된 라이브러리를 정제하고, NextSeq 500(Illumina, Inc., USA)를 이용하여 고속 시퀀싱(HT S)을 수행하였다.

[0115] 실시간 PCR

[0116] TRIzol(Invitrogen)을 이용하여 총 RNA를 추출하고 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix와 gDNA Remover(Toyobo, Osaka, Japan)를 이용하여 500 ng의 총 RNA로부터 cDNA를 합성하였다. SYBR Green Real Time PCR Master Mix(Toyobo, Osaka, Japan)를 이용하여 C1000 a→ a C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad) 상에서 정량적 RT-PCR을 수행하였다. 유전자 발현 수준은 상응하는 cDNA 시료의 베타-2 마이크로글로불린(B2M) mRNA 발현 수준에 대해 정규화하였다. 모든 PCR 프라이머는 Bioneer(Daejeon, Korea)에서 구입하였다. 다음의 프라이머를 사용하였다: SIRT3 (정"넙* 5' -GAACTACAAGCCCAACGTCA-3' , 역방향 5' -AAGTTCATGAGCTCAACC-3'), RB1 (정"넙* 5' -GAAGCAACCCTCCTAAACCAC-3' , 역방향 5' -CTGCTTTTGATTCGTGTCG-3'), 및 B2M (정"넙* 5' -TTACTCAGTCATCCAGCAGA-3' , 역방향 5' -AGAAAGACCAGTCCTTGCTGA-3').

[0118] 웨스턴 블롯팅

[0119] 웨스턴 블롯팅은 종래 보고된 방법에 따라 수행하였다[26]. 사용된 1차 항체는 다음과 같다: SIRT3(Cell Signaling Technology, Danvers MA, USA; clone C73E3; 희석 1:1000), CDK4(DCS156, 1:1000), CDK6(DCS83, 1:1000), Phospho-Rb(Ser807/811) (D20B12, 1:1000), Rb(4H1, 1:2000), PCNA(D3H8P, 1:2000), GLUT1(1:2000) (이상 Abcam(Cambridge, UK)에서 구입) 및 Ki67(Santa Cruz, Dallas TX, USA; MIB-1, 1:500). 생물학적 반복 실험에 대한 웨스턴 블롯팅 실험 결과 유사한 발현 데이터가 나타나 결과의 재현성을 뒷받침하였다. 화학발광 반응에서 누적된 신호의 영상에 대한 화학발광 웨스턴 블롯팅을 직접적으로 디지털 시각화할 수 있는 ChemiDoc XRS(Biorad)를 사용하였다. 밴드의 정량을 위해, Image Lab 소프트웨어(Bio-Rad, Hercules, California, USA)로 이미지를 분석하였다.

[0121] 유세포 분석

- [0122] 아폽토시스 정량을 위해, 아넥신 V-FITC 아폽토시스 검출 키트(BD Pharmingen™, NJ, USA) 및 프로피듐 이오다이드(PI)를 이용하여 제조사의 설명서에 따라 이중 염색을 수행하였다. 지정된 약물과 배양 후 HepG2 및 Huh7 세포를 수집하여 얼음으로 식힌 PBS로 2회 세척 후 결합 완충액 200 μ L에서 재부유시켰다. 아넥신 V-FITC를 세포에 첨가하고 15분 간 25°C 암조건에서 배양하였다. PI(10 mL)를 튜브에 첨가하고 5분 간 4°C 암조건에서 배양하였다. 이후, CELL Quest 소프트웨어(BD)를 이용하여 시료에 대한 유세포 분석을 수행하였다. 사분원 통계 분석을 통해 상이한 사분면의 세포 분획을 분석하였다. 우하단 사분면의 세포(아넥신-V+/PI-)는 초기 아폽토시스를 나타내며 우상단(아넥신-V+/PI+)은 후기 아폽토시스를 나타낸다. 세포주기 분석을 위해, 지정된 약물과 배양한 뒤 HepG2 및 Huh7 세포를 수집한 후 4°C, 70% 에탄올에서 1시간 동안 배양하였다. PBS로 세척한 다음, 세포를 5 μ g/mL 농도의 PI 및 10 mg/mL 농도의 RNase A와 배양하고 30분-시간 동안 37°C에서 배양하였다. FlowJo 소프트웨어(Tree Star Inc., Ashland, OR, USA)로 DNA 함량을 분석하였다.
- [0124] *이동 분석*
- [0125] 24-웰 플레이트와 코팅되지 않은 폴리카보네이트 막(BioCoat; BD Biosciences, Heidelberg, Germany)을 이용하여 화학 이동(Chemomigration) 어세이를 수행하였다. 0.1% FBS 및 소라페닙 함유 배지 내의 총 50,000개 세포에 PD0332991 또는 소라페닙 및 PD033291의 조합을 첨가하였다. 하부 웰에는 10% FBS가 보충된 배지를 채워넣었다. 24시간 뒤, 이동한 세포를 100% 메탄올로 고정시키고 물에 용해된 1.5%(w/v) 톨루이딘 블루로 염색하였다. 이미지는 Olympus Cell Sens 소프트웨어(Carl Zeiss Microscopy, GmbH, Jena, Germany)를 이용하여 Olympus BX53 현미경으로 기록하였다.
- [0127] *면역염색*
- [0128] 면역조직화학(IHC) 및 면역형광(IF)을 종래 보고된 방법에 따라 수행하였다[27]. 다음의 1차 항체를 이용하여 면역염색을 수행하였다: SIRT3 (Cell Signaling Technology, Danvers MA, USA; clone C73E3; 희석 1:500); Ki67(Dako, Glostrup, Denmark; MIB-1;1:500); GLUT1(1:500) 및 Ki67 (SP6, 1:500, Abcam, Cambridge, UK). 이미지는 Olympus Cell Sens 소프트웨어(Carl Zeiss Microscopy, GmbH, Jena, Germany)를 이용하여 Olympus BX53 현미경으로 기록하였다. Ki67-양성 세포 및 인산화된 망막아세포종 단백질(pRb)의 비율은 DAPI 염색된 핵을 가지는 세포를 계수함으로써 계산하였다.
- [0130] *암 유전자 도해(TCGA) 데이터 분석*
- [0131] TCGA 간 HCC 데이터의 mRNA 수준을 OncoLnc TCGA 데이터 포털(www.oncolnc.org)로부터 획득하였다. 고발현 및 저발현 유전자군(50-50 백분위)을 가지는 360개 HCC 시료를 이용하여 두 개의 상이한 유전자 간의 상관관계 그래프를 도출하였다. 매핑을 위해 GraphPad Prism 5(GraphPad 소프트웨어, San Diego, CA, USA)를 사용하였다.
- [0133] *통계적 분석*
- [0134] 통계적 분석은 GraphPad Prism을 이용하여 수행하였다 소프트웨어 (GraphPad 소프트웨어, Inc., San Diego, CA). 결과는 평균±표준오차(범위)로 표시하였으며, P값<0.05인 경우 통계적 유의성을 가지는 것으로 간주하였다. 그룹 간 비교는 맨-휘트니 검정을 이용하여 수행하였다.
- [0136] **실험결과**
- [0137] *HCC 환자에서의 SIRT3 발현*
- [0138] ¹⁸F-플루오로디옥시글루코스(FDG) PET/CT를 이용하여 글루코스 대사를 평가하였다. 글루코스 흡수 및 SIRT3 발현 간의 관계를 조사하기 위해, 21명의 HCC 환자를 ¹⁸F-FDG 흡수에 딸 두 그룹으로 나누었다: 당분해 활성화와 ¹⁸F-FDG 흡수가 높은 9명의 HCC 환자와 당분해 활성화와 ¹⁸F-FDG 흡수가 낮은 12명의 HCC 환자. SIRT3의 mRNA 발

현은 저-당분해 군에서 더 높았다(도 1a). 이러한 관찰 결과를 확인하기 위해 두 그룹(각 그룹당 n=6)의 HCC 조직에 대한 IHC 분석을 수행하였다. FDG 흡수가 낮은 환자는 중앙 부위에서막의 GLUT1 발현과 Ki67 발현은 낮았으며, SIRT3 발현은 높았다(도 1b). FDG 흡수가 높은 군에서는 높은 Ki67 발현 및 GLUT1 발현과 낮은 SIRT3 발현이 관찰되었다. 또한, HCC 환자에서 SIRT3의 발현을 웨스턴 블롯팅으로 관찰하였다(도 8). 높은 ¹⁸F-FDG 흡수를 보이는 HCC 환자에서 SIRT3의 감소가 관찰되었다. 종합하면, SIRT3 발현은 HCC 환자에서의 해당 대사(glycolytic metabolism) 및 세포 증식과 관련이 있는 것으로 나타났다.

[0140] *HCC 세포에서의 SIRT3 발현 차이*

[0141] 3개의 HCC 세포주(HepG2, Hep3B 및 Huh7) 및 상이한 증식을 및 해당 활성을 보이는 이들의 이식 모델에서 SIRT3의 발현을 측정하였다. HepG2 세포는 mRNA와 단백질 수준에서 가장 높은 SIRT3 발현을 보였다(도 2a 및 2b). 인간 HCC 환자와 유사하게 HCC 이식 모델에서도 GLUT1와 SIRT3 간 음의 상관관계가 관찰되었다(도 2c). 또한, SIRT3와 Ki67 사이에도 유의한 음의 상관관계가 있었다. HepG2 및 Hep3B 세포는 낮은 Ki67 발현과 높은 SIRT3 발현을 보인 반면, Huh7 및 SK-HEP1 세포는 높은 Ki67 발현과 낮은 SIRT3 발현을 보였다. 이러한 결과는 인간 HCC 시료에 대한 TCGA 데이터베이스 분석 결과와도 일치한다. 스피어만(Spearman) 상관 역시 SIRT3과 Ki67 간(스피어만 계수 $r = -0.3093$, $P < 0.0001$) 및 SIRT3과 HK2 간(스피어만 계수 $r = -0.239$, $P < 0.0001$)의 유의한 음의 상관관계를 보여주었다(스피어만 계수 $r = *? * 0.3093$, $P < 0.0001$). 이러한 발견을 추가적으로 확인하기 위해, SIRT3 기저 발현량이 낮은 Huh 7 세포에서 SIRT3를 과발현시켰다. SIRT3 과발현은 Ki67 및 GLUT1 발현을 감소시켰으며 글루코스 흡수 또한 유의하게 저해하였다(도 2d 및 2e). 이를 종합하면, SIRT3 발현이 HCC 세포 및 이들의 이식 모델에서 해당 대사 및 세포 증식과 음의 상관관계를 가짐을 알 수 있다.

[0143] *SIRT3 발현 수준과 소라페닙 처리 간의 관계*

[0144] 본 발명의 실험결과가 HCC에서 SIRT3이 중요한 역할을 함을 보였기때문에, SIRT3의 발현이 소라페닙 처리에 의해 변화하는지를 확인하고자 HCC 세포주를 소라페닙과 함께 48시간 동안 배양하였다. 그 결과, 10 μM의 소라페닙 처리 후 HCC 세포에서의 SIRT3 발현이 감소함을 확인하였다(도 3a). 나아가, Huh7 세포 증식은 SIRT3를 형질주입한 경우에 보다 두드러지게 감소하였다(도 3b 및 도 3c). 또한, HepG2 세포를 이용하여 SIRT3 KD 세포주를 제작한 결과, 대조군 세포에 비해 소라페닙에 대한 민감성이 유의하게 감소함을 관찰함으로써 SIRT3 발현이 HCC 세포의 소라페닙에 대한 반응성을 증진시킴을 확인하였다(도 3d).

[0146] *SIRT3 및 pRb 간의 음의 상관관계*

[0147] CDK4/CDK6 키나아제에 대한 선택적 억제제인 PD0332991는 Rb의 인산화 활성을 차단할 수 있다[28]. HCC 환자에서의 pRb 발현을 측정함으로써 PD0332991가 SIRT3 발현 조절을 통해 소라페닙의 민감성을 증가시키는 후보 약물이 될 수 있는지를 확인하고자 하였다. HCC 이식 모델에 대해 pRb 특이적 항체를 이용한 IHC를 수행하였다. 낮은 SIRT3 발현을 보이는 Huh7 및 skHep1-이식 모델은 pRb의 발현량이 높아, pRb 및 SIRT3의 발현은 HCC 이식 모델에서 음의 상관관계를 가짐을 확인하였다(도 4a). 인간 HCC에서, Rb mRNA 수준은 유의하게 높았으며 SIRT3 mRNA는 저 ¹⁸F-FDG 군에 비해 고 ¹⁸F-FDG 군에서 상대적으로 높았다(도 4b). TCGA 데이터 분석 결과 스피어만 상관 역시 인간 HCC 환자에서 SIRT3 및 Rb1 발현 수준 간에 유의한 음의 상관관계를 보였다(스피어만 계수 $r = -0.3408$, $P < 0.0001$). 나아가, 인간 HCC 환자의 pRb 및 SIRT3 발현 역시 음의 상관관계가 관찰되었다(도 4c).

[0149] *CDK4/6 억제제 처리에 의해 SIRT3 발현이 증가하였다*

[0150] SIRT3 및 pRb가 관련되어 있음을 발견하였으므로, PD0332991가 SIRT3의 발현을 조절함으로써 HCC 세포의 소라페닙에 대한 민감성을 증진시킬 수 있는지를 조사하였다. PD0332991를 처리하자, HepG2에서 SIRT3 발현이 증가하였다. SK-HEP1 및 Huh7 세포에서는, SIRT3 발현이 대조군보다 조금 증가하였으나(도 5a), Hep3B 세포에서는 유의한 변화가 관찰되지 않았다. Hep3B 세포에 CDK4/6 억제에 대한 상대적인 저항성을 야기하는 Rb 돌연변이가 존재할 가능성이 있다[29, 30]. 따라서, Hep3B 세포는 추가실험 대상에서 제외되었다. PD0332991 처리에 더하여, HCC 세포에서 CDK4/6 녹다운에 의한 SIRT3 발현 변화를 조사하였다. PD0332991 처리 시와 유사하게 HepG2

세포에서 CDK4/6를 녹다운하자 SIRT3 발현이 증가한 반면, 증식 마커인 PCNA의 발현은 감소하였다(도 5b-5d). 본 발명의 데이터는 SIRT3 발현이 글루코스 대사와 음의 상관관계를 가짐을 보여주었으므로(도 1a 및 1b), 마이크로어레이 분석으로 HepG2 세포에서 CDK4/6 억제 후 해당- 및 TCA-관련 유전자의 발현 변화를 조사하였다. 그 결과, CDK4/6 KD HepG2 세포에서 SLC2A1(배수 변화: 0.12), PFKP(배수 변화: 0.341), PKM(배수 변화: 0.457) 및 HK2(배수 변화: 0.693)를 포함하는 해당-관련 유전자의 발현 감소가 관찰되었다(도 5e). 나아가, 두 그룹(스크램블 vs. CDK4/6 KD) 간 가장 조절되지 않는 유전자는 다음의 카테고리에 속하는 것들이다: DNA 복제, 감수분열 세포주기 진행, 염색체 분리, 지방산 산화 조절 및 지질 이화 과정 조절. PD0332991 처리 후의 해당-관련 유전자 조절 장애율은 CDK4/6 KD 이후에 나타난 것보다 낮았다(도 5e). 이에, 본 발명자들은 CDK4/6 억제를 통해 SIRT3 발현을 조절함으로써 당분해 및 세포 증식을 억제하는 새로운 메커니즘을 발견하였다.

[0152] PD0332991과의 병용 투여를 통한 소라페닙 항암 효과의 강화

[0153] 다음으로, CDK4/6 억제제인 PD0332991를 통해 SIRT3 발현량을 증가시키면 HCC 세포에 대한 소라페닙의 항암 효과가 증진되는지를 조사하고자 하였다. 소라페닙과 PD0332991를 HepG2에 병용 처리한 결과, SIRT3의 mRNA와 단백질 발현이 모두 증가하였다(도 6a 및 6b). 아울러, 단독 처리군에 비해 세포 생존율도 보다 뚜렷하게 감소하였다(도 6c). 추가적인 확인을 위해 HepG2 세포의 3차원적 스페로이드를 생성시킨 결과 두 가지 약물의 병용 투여 후 스페로이드 크기가 단독 투여군에 비해 감소하였다. 웨스턴 블롯팅 분석을 통해 PD0332991 및 두 약물의 병용 투여 후 대조군 및 소라페닙 처리군에 비해 SIRT3 발현이 증가함을 확인하였다. Huh7 세포 역시 매우 낮은 기저 수준을 가지는 SIRT3 mRNA 발현을 제외하고는 HepG2 세포와 동일한 결과를 보였다(도 6d 및 6e). 병용 투여에 의한 항암 효과의 상승을 확인하기 위해, 소라페닙, PD0332991 또는 이들의 조합을 처리한 뒤 세포의 이동을 측정하였다. HepG2 및 Huh7 세포의 이동은 단독 처리군에 비해 병용 처리군에서 더 감소하였다(도 7a-7c). HepG2 세포 및 Huh7 세포에 대해 세포주기 분석, ki67 면역염색 및 아포토시스 어세이를 수행하였다. 세포주기 분석결과 HepG2 세포에서 단독 투여군에 비해 G2/M기가 감소됨을 확인하였다. Huh7 세포에서, 병용 투여에 의해 G2/M 및 S기가 감소하였다(도 9a). 또한, HepG2 및 huh7 세포에서 Ki67에 대한 면역염색을 수행한 결과 병용 투여를 한 경우 Ki67 양성 세포는 극적으로 감소하였다(도 9b 및 9c). 나아가, 아넥신 V-PI 염색 결과를 통해 소라페닙과 PD0332991의 병용 투여가 초기 및 후기 아포토시스를 증가시킴을 알 수 있었다(도 7d 및 9d). 이를 종합하면, CDK4/6 억제를 통해 SIRT3의 발현을 증가시키면 HCC 세포의 소라페닙에 대한 민감성이 증가함을 알 수 있다.

[0155] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0157] 참고문헌

[0158] 1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394-424.

[0159] 2. Forner A, Reig M, Bruix J. *Lancet*. 2018;391(10127):1301-14.

[0160] 3. Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, Chen C, Zhang X, Vincent P, McHugh M, et al. *Cancer Res*. 2004;64(19):7099-109.

[0161] 4. Gauthier A, Ho M. Role of sorafenib in the treatment of advanced hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatol Res*. 2013;43(2):147-54.

[0162] 5. Villanueva A, Llovet JM. *Clin Cancer Res*. 2012;18(7):1824-6.

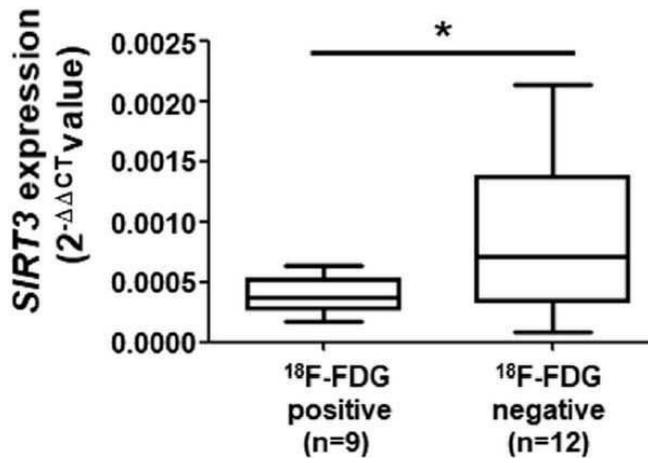
[0163] 6. Abou-Alfa GK, Schwartz L, Ricci S, Amadori D, Santoro A, Figer A, De Greve J, Douillard JY, Lathia C, Schwartz B, et al. *J Clin Oncol*. 2006;24(26):4293-300.

[0164] 7. Yuan H, Su L, Chen WY. *Onco Targets Ther*. 2013;6:1399-416.

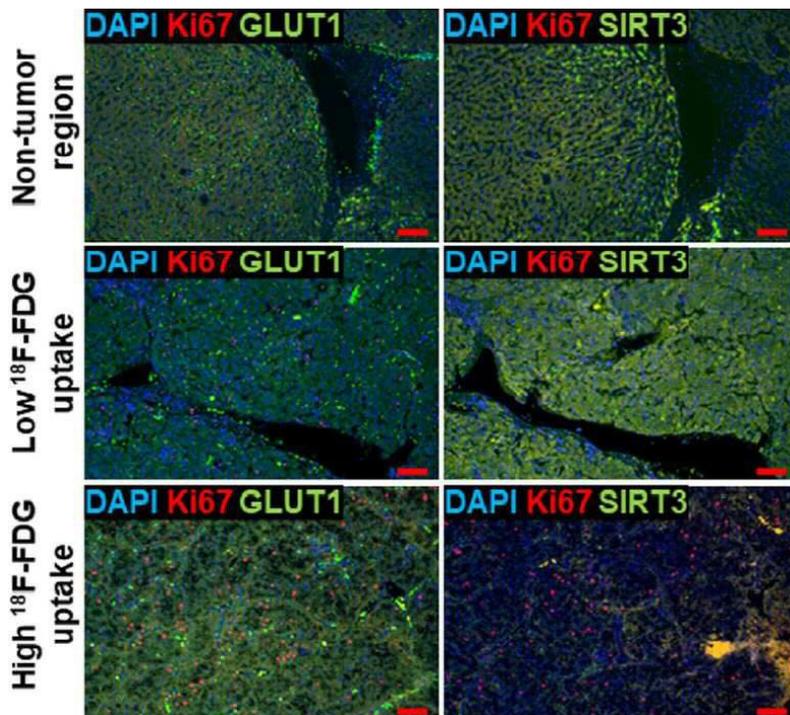
- [0165] 8. Verdin E, Hirschey MD, Finley LW, Haigis MC. *Trends Biochem Sci.* 2010;35(12):669-75.
- [0166] 9. Haigis MC, Deng CX, Finley LW, Kim HS, Gius D. *Cancer Res.* 2012;72(10):2468-72.
- [0167] 10. Onyango P, Celic I, McCaffery JM, Boeke JD, Feinberg AP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(21):13653-8.
- [0168] 11. Schwer B, North BJ, Frye RA, Ott M, Verdin E. *J Cell Biol.* 2002;158(4):647-57.
- [0169] 12. Wang Q, Li L, Li CY, Pei Z, Zhou M, Li N. *Neuroscience.* 2015;286: 109-21.
- [0170] 13. Alhazzazi TY, Kamarajan P, Verdin E, Kapila YL. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1816(1):80-8.
- [0171] 14. Xiong Y, Wang M, Zhao J, Han Y, Jia L. *Int J Oncol.* 2016;49(6):2227-35.
- [0172] 15. Torrens-Mas M, Oliver J, Roca P, Sastre-Serra J. *Cancers (Basel).* 2017;9(7):50.
- [0173] 16. Alhazzazi TY, Kamarajan P, Joo N, Huang JY, Verdin E, D'Silva NJ, Kapila YL. *Cancer.* 2011;117(8):1670-8.
- [0174] 17. George J, Nihal M, Singh CK, Zhong W, Liu X, Ahmad N. *J Invest Dermatol.* 2016;136(4):809-18.
- [0175] 18. Zhang B, Qin L, Zhou CJ, Liu YL, Qian HX, He SB. *Asian Pac J Trop Med.* 2013;6(8):649-52.
- [0176] 19. Liu Y, Liu YL, Cheng W, Yin XM, Jiang B. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2017;21(5):978-98.
- [0177] 20. Desouki MM, Doubinskaia I, Gius D, Abdulkadir SA. *Hum Pathol.* 2014;45(5):1071-7.
- [0178] 21. Dong XC, Jing LM, Wang WX, Gao YX. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;475(3):245-50.
- [0179] 22. Yu W, Denu RA, Krautkramer KA, Grindle KM, Yang DT, Asimakopoulos F, Hematti P, Denu JM. *J Biol Chem.* 2016;291(7):3268-79.
- [0180] 23. Song CL, Tang H, Ran LK, Ko BC, Zhang ZZ, Chen X, Ren JH, Tao NN, Li WY, Huang AL, et al. *Oncogene.* 2016;35(5):631-41.
- [0181] 24. Finley LW, Carracedo A, Lee J, Souza A, Egia A, Zhang J, Teruya-Feldstein J, Moreira PI, Cardoso SM, Clish CB, et al. *Cancer Cell.* 2011;19(3):416-28.
- [0182] 25. Zhang CZ, Liu L, Cai M, Pan Y, Fu J, Cao Y, Yun J. *PLoS One.* 2012;7(12):e51703.
- [0183] 26. Ramesh S, Govindarajulu M, Lynd T, Briggs G, Adamek D, Jones E, Heiner J, Majrashi M, Moore T, Amin R, et al. *PLoS One.* 2018;13(1):e0190350.
- [0184] 27. Lee M, Marinoni I, Irmeler M, Psaras T, Honegger JB, Beschorner R, Anastasov N, Beckers J, Theodoropoulou M, Roncaroli F, et al. *Acta Neuropathol.* 2013;126(1):137-50.
- [0185] 28. Bollard J, Miguela V, Ruiz de Galarreta M, Venkatesh A, Bian CB, Roberto MP, Tovar V, Sia D, Molina-Sanchez P, Nguyen CB, et al. *Gut.* 2017;66(7):1286-96.
- [0186] 29. Rivadeneira DB, Mayhew CN, Thangavel C, Sotillo E, Reed CA, Grana X, Knudsen ES. *Gastroenterology.* 2010;138(5):1920-30.
- [0187] 30. Ezhevsky SA, Nagahara H, Vocero-Akbani AM, Gius DR, Wei MC, Dowdy SF. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(20):10699-704.

도면

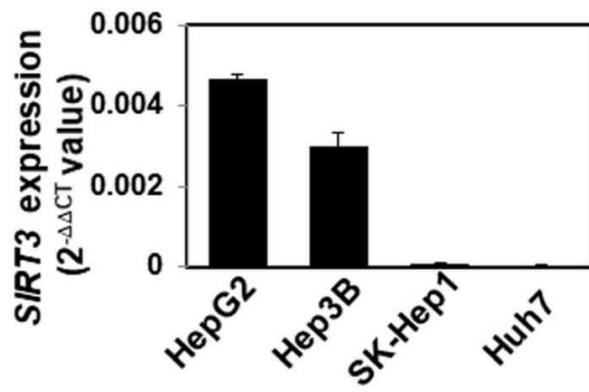
도면1a



도면1b



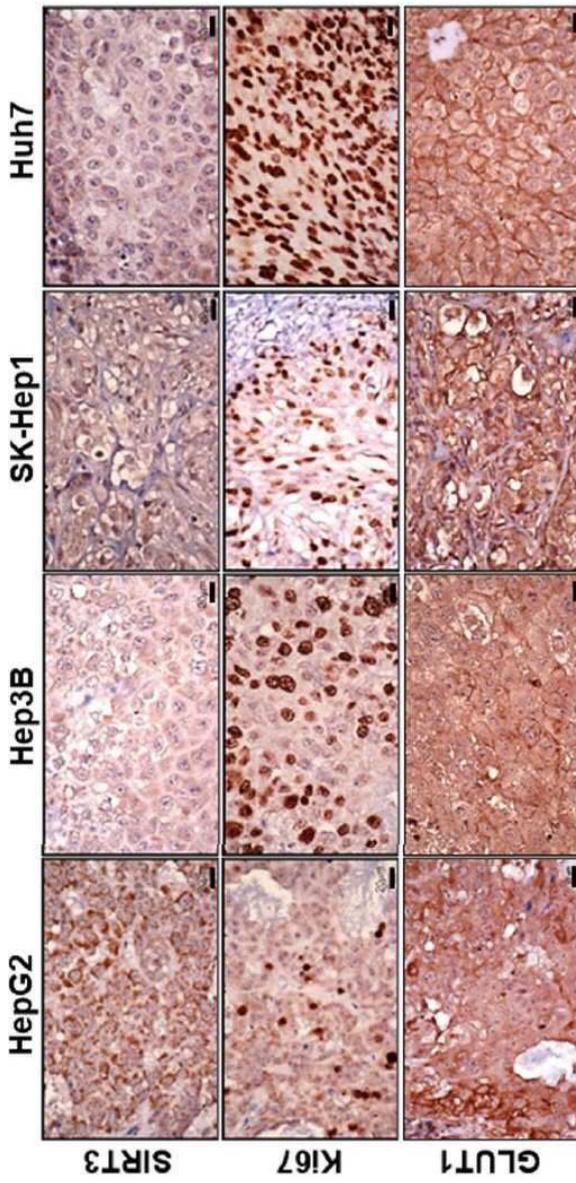
도면2a



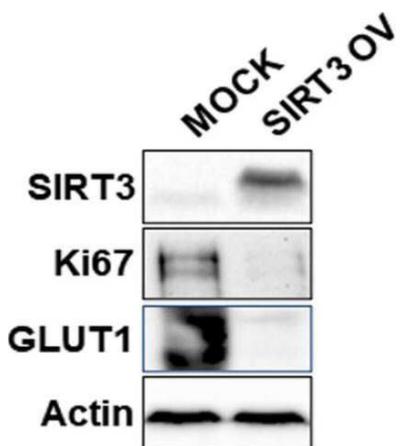
도면2b



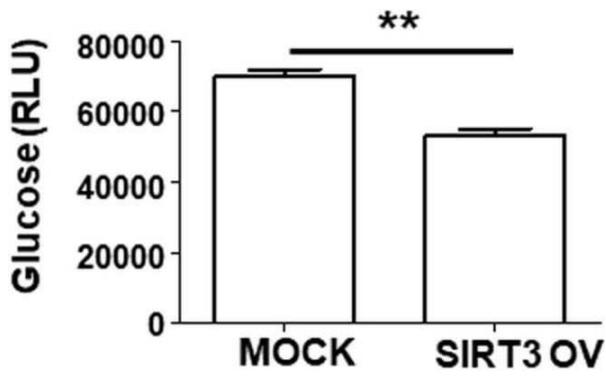
도면2c



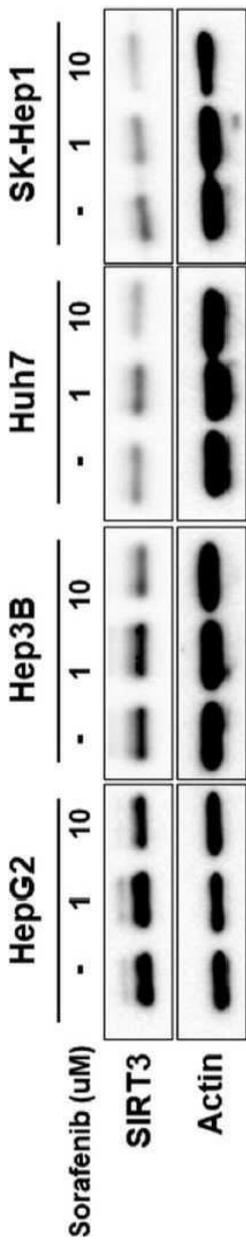
도면2d



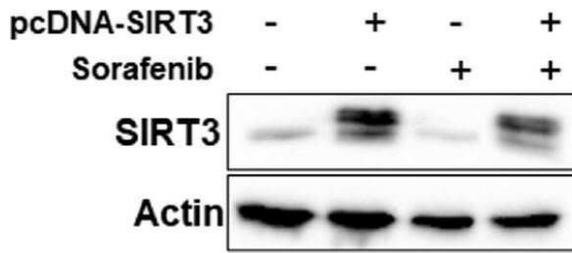
도면2e



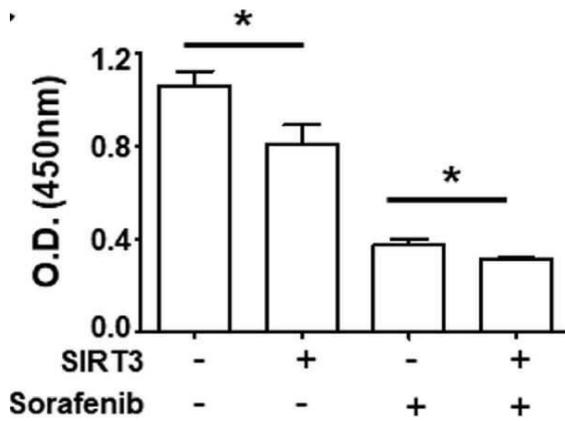
도면3a



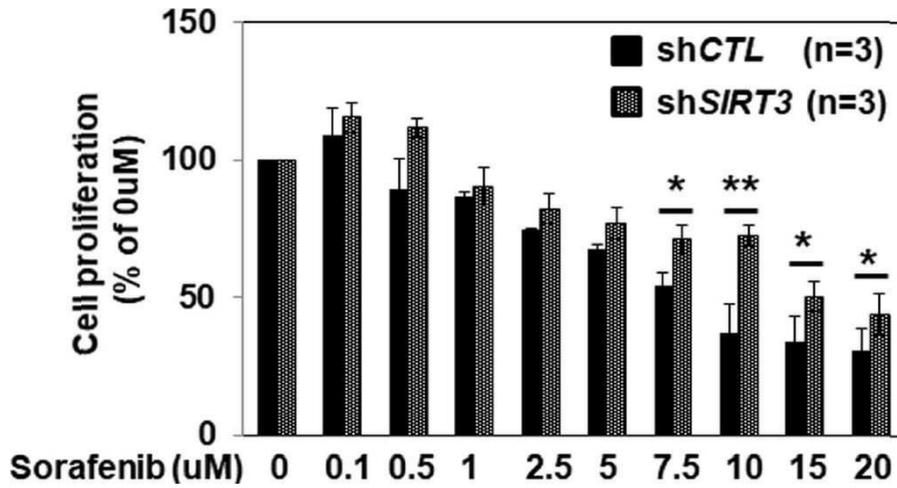
도면3b



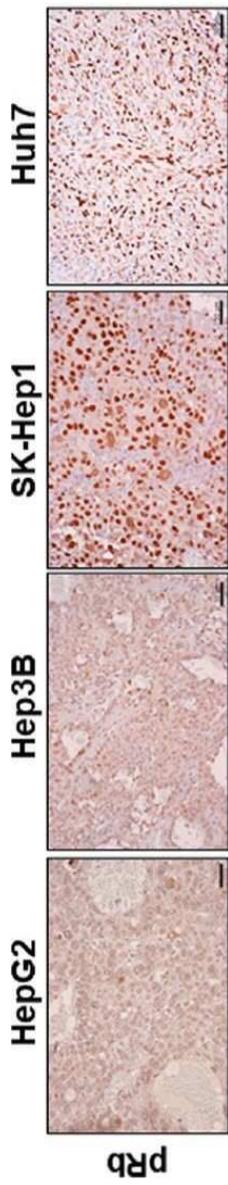
도면3c



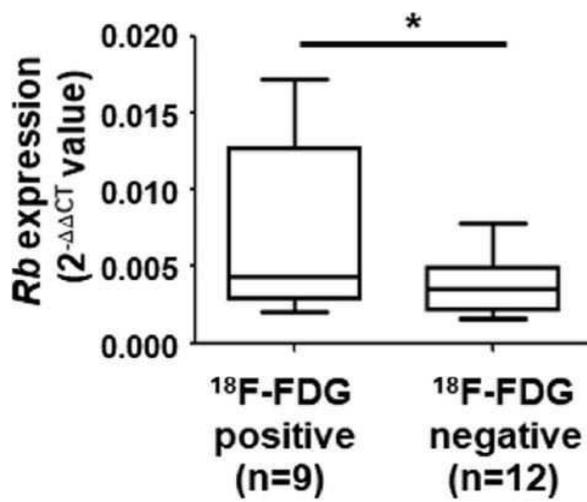
도면3d



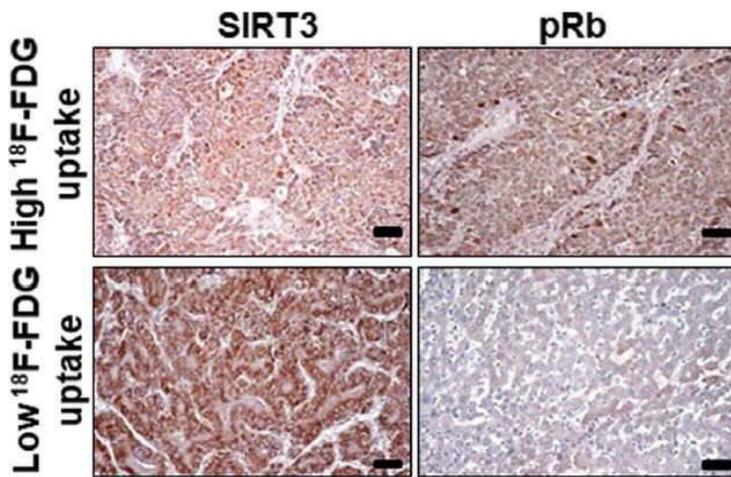
도면4a



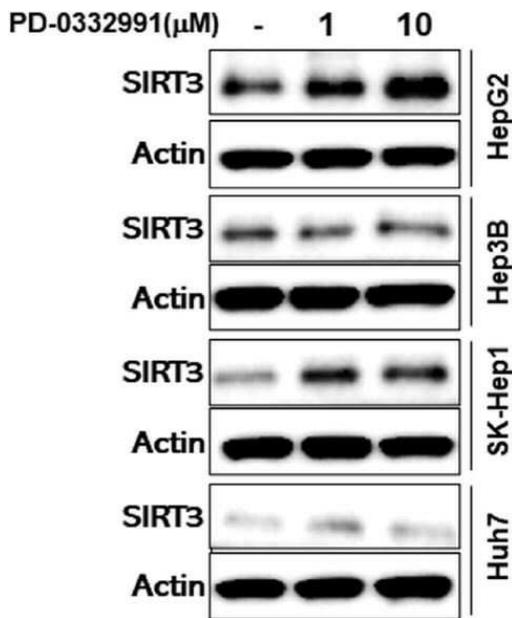
도면4b



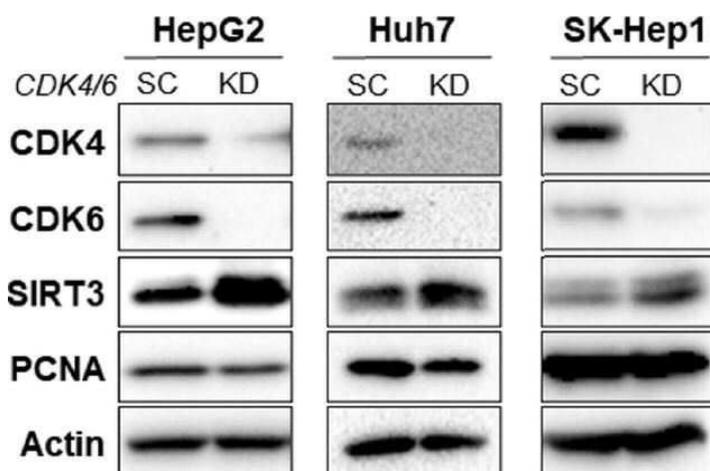
도면4c



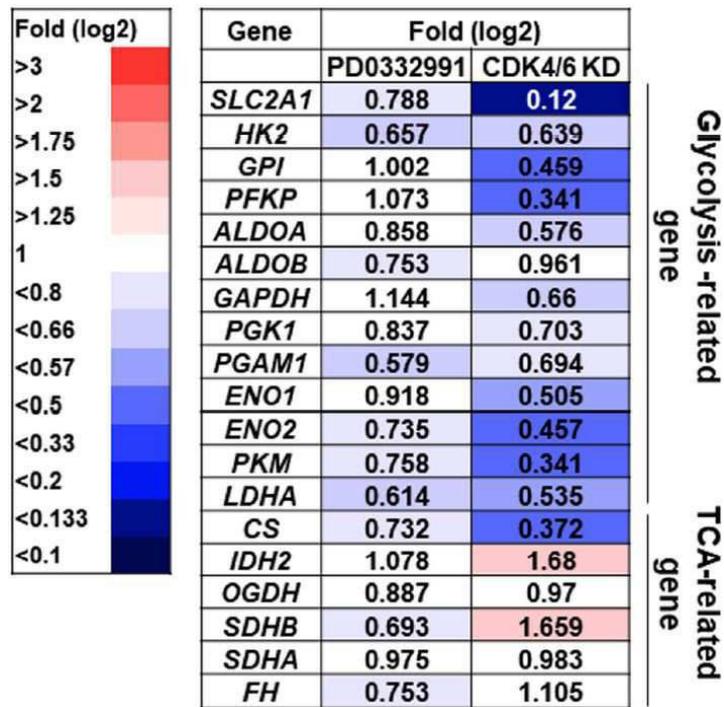
도면5a



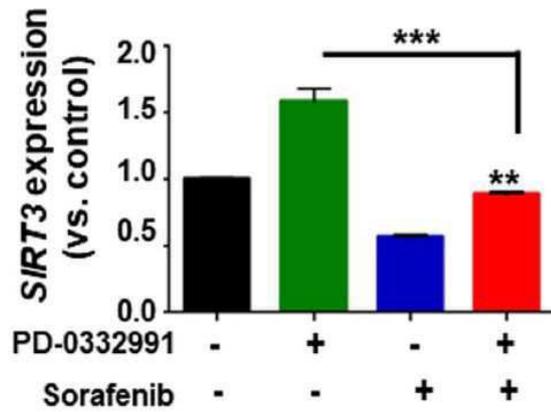
도면5b



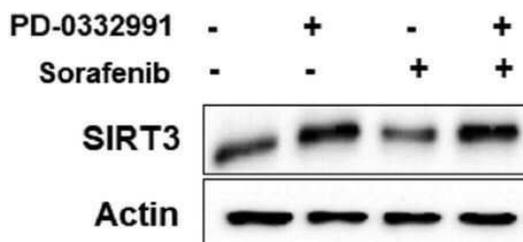
도면5c



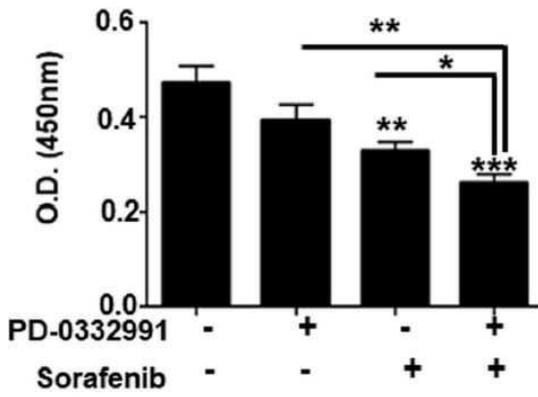
도면6a



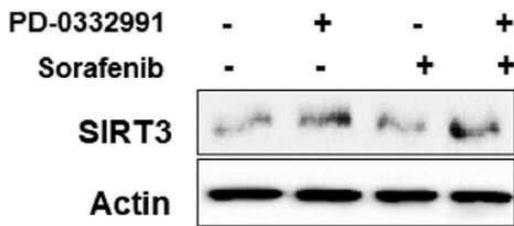
도면6b



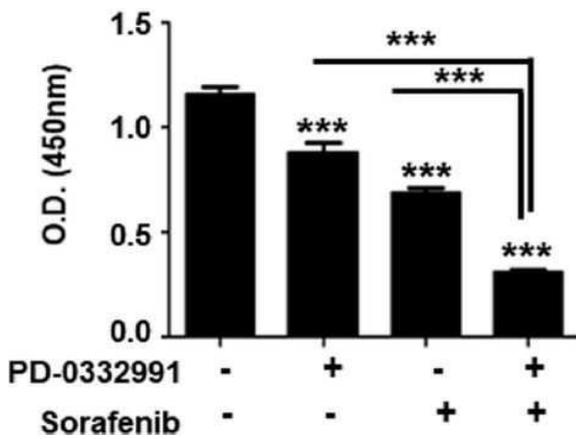
도면6c



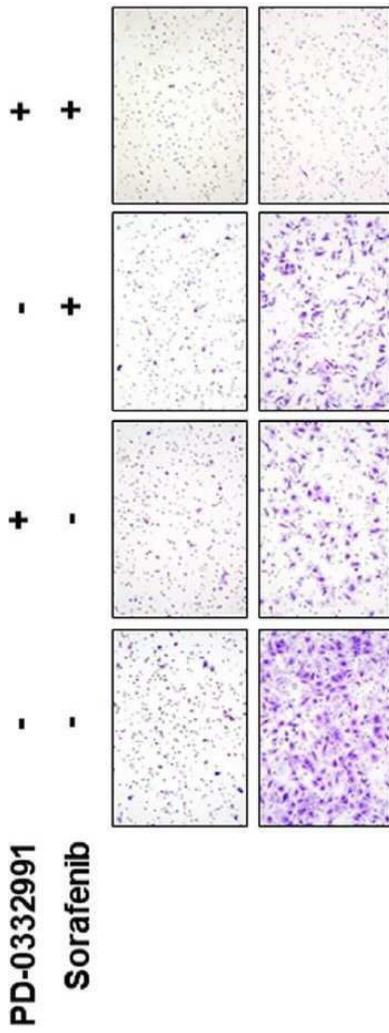
도면6d



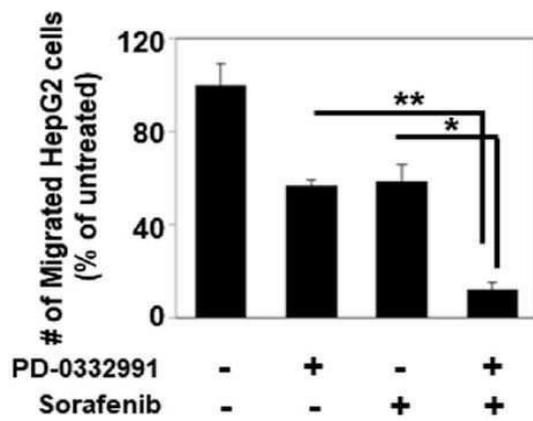
도면6e



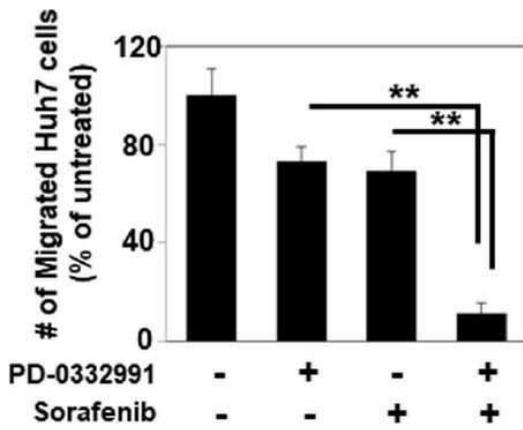
도면7a



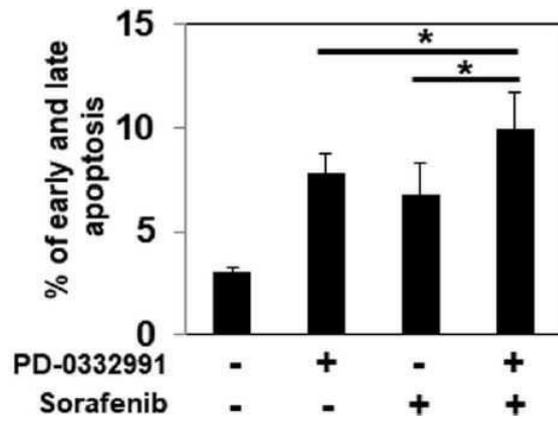
도면7b



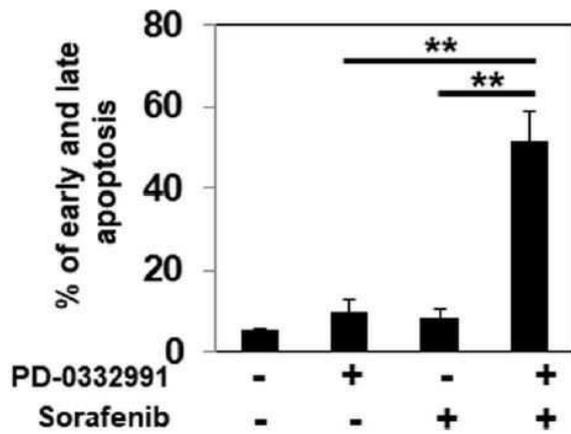
도면7c



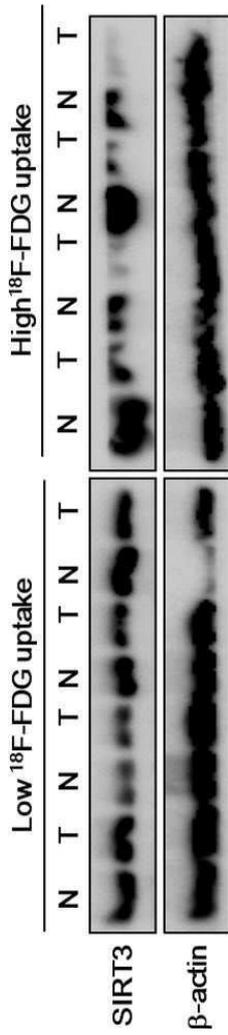
도면7d



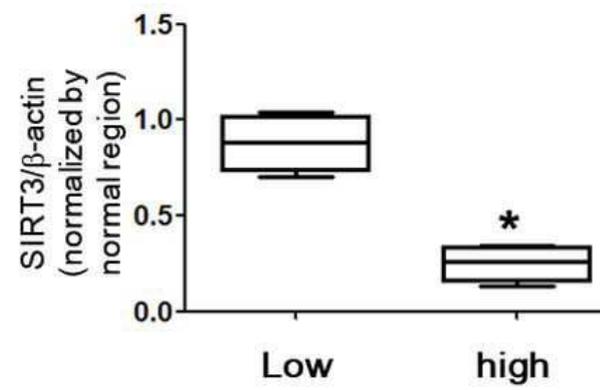
도면7e



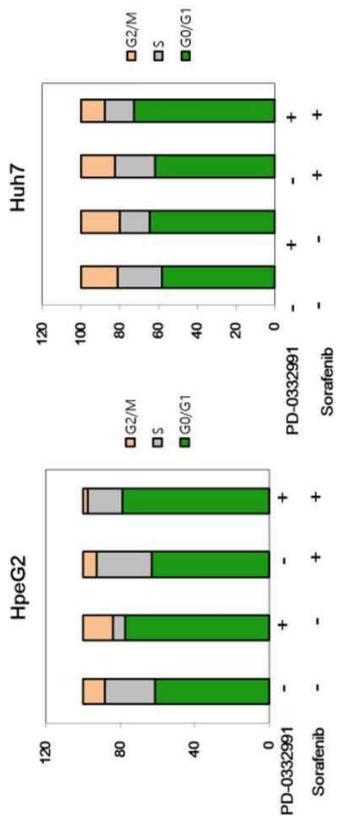
도면8a



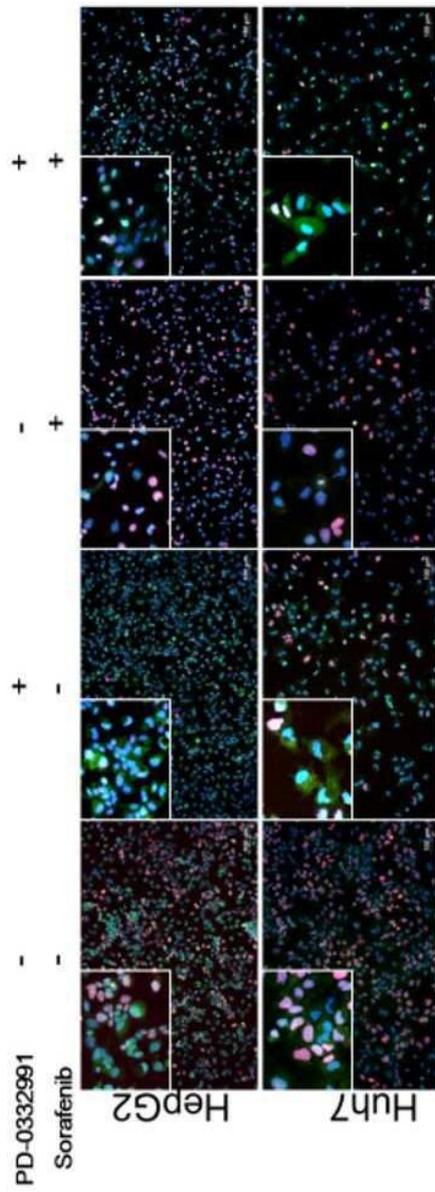
도면8b



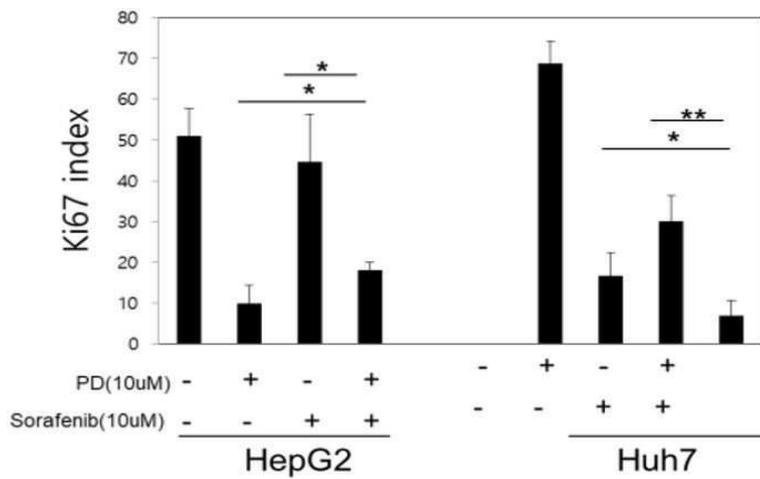
도면9a



도면9b



도면9c



도면9d

