(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0055632
(43) 공개일자 2024년04월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*A61K 31/497* (2006.01) *A61K 31/416* (2006.01)
*A61K 31/4985* (2006.01) *A61K 31/517* (2006.01)
*A61K 31/519* (2006.01) *A61K 31/553* (2006.01)
*A61P 35/00* (2006.01) *G01N 33/50* (2017.01)
(52) CPC특허분류
*A61K 31/497* (2013.01)
*A61K 31/416* (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0109267
(22) 출원일자 2023년08월21일
심사청구일자 2023년08월21일
(30) 우선권주장
1020220134462 2022년10월18일 대한민국(KR)

(71) 출원인
**이화여자대학교 산학협력단**
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
**한국과학기술연구원**
서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)
(72) 발명자
**송은주**
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동)
**신형경**
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동)
*(뒷면에 계속)*
(74) 대리인
**리앤목특허법인**

전체 청구항 수 : 총 16 항

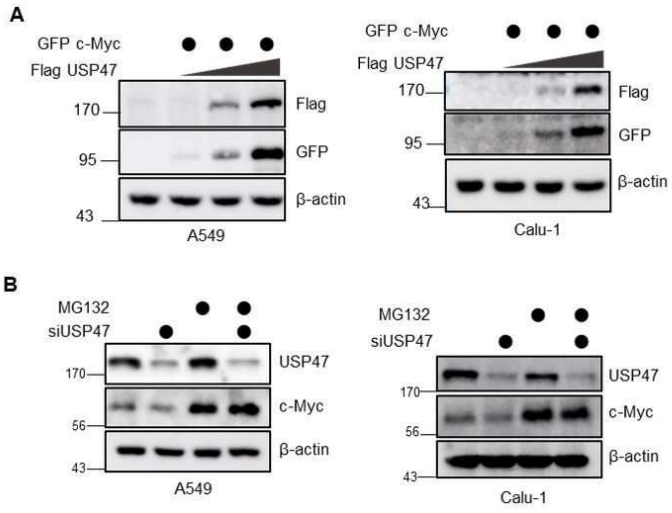
(54) 발명의 명칭 **USP47 (Ubiquitin-specific protease 47) 발현 억제를 통한 c-Myc 관련 질병의 예방 또는 치료용 조성물 및 이의 용도**

## (57) 요 약

본 발명은 USP47(Ubiquitin-specific protease47)의 발현 또는 활성을 억제하는 제제를 포함하는, c-Myc 관련 질병의 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

일 양상에 따르면, USP47의 발현/활성을 저해하는 조성물을 활용하여 oncogene인 c-Myc의 발현과 그 활성을 저해시킬 수 있는 바, 이를 통해 다양한 암의 치료제 또는 이의 스크리닝에 유용하게 이용할 수 있다.

*대 표 도* - 도6



(52) CPC특허분류
***A61K 31/4985*** (2013.01)
***A61K 31/517*** (2013.01)
***A61K 31/519*** (2013.01)
***A61K 31/553*** (2013.01)
***A61P 35/00*** (2018.01)
***G01N 33/5008*** (2013.01)
*A61K 2300/00* (2023.05)
*G01N 2333/96425* (2013.01)
(72) 발명자
**황수아**
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동)
**김은경**
서울특별시 성북구 화랑로 14길 5
**추현아**
서울특별시 성북구 화랑로 14길 5

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711161754
과제번호 2020R1A4A4079494
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 집단연구지원
연구과제명 혁신 항암제 개발을 위한 탈유비퀴틴화 효소 제어 네트워크 연구실
기 여 율 7/10
과제수행기관명 이화여자대학교
연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711153876
과제번호 2019R1A2C2004052
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)
연구과제명 세포 성장 조절 관련 탈유비퀴틴화 효소의 세포내 활성조절 네트워크 규명
기 여 율 3/10
과제수행기관명 이화여자대학교
연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

USP47 (Ubiquitin-specific protease 47) 단백질 또는 이의 단편의 발현 또는 활성을 억제하는 제제를 포함하는, c-Myc 관련 질병의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

### 청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 USP47 단백질 또는 이의 단편은 USP47의 UCH 도메인, UBL1 도메인 및 UBL2 도메인으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것인, 조성물.

### 청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 c-Myc의 분해를 촉진하는 것인, 조성물.

### 청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 USP47의 발현 또는 활성을 억제하는 제제는 K-552, 이의 약학적으로 허용가능한 염, 이의 수화물 및 이의 용매화물로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 것인, 조성물.

### 청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 K-RAS의 발현 또는 활성을 억제하는 제제를 추가로 포함하는 것인, 조성물.

### 청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 K-RAS의 발현 또는 활성을 억제하는 제제는 Sotorasib, Adagrasib, GFH925, JAB-21822, YL-15293, ELI-002 7P, HBI-2438, JDQ443, JNJ-74699157, D3S-001, BI 1823911, IBI351, MK-1084, LY3499446, JAB-21822, LY3537982, GDC-6036, HS-10370, D-1553 및 GEC255로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것인, 조성물.

### 청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 c-Myc 관련 질병은 폐암, 대장암 및 유방암으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것인, 조성물.

### 청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 c-Myc 관련 질병은 USP47의 과발현 또는 과활성으로 인해 발병하는 것인, 조성물.

### 청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 암 또는 암세포의 성장, 증식, 전이 및 침투로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 억제하는 것인, 조성물.

### 청구항 10

USP47 단백질 또는 이의 단편의 발현 또는 활성을 억제하는 제제를 포함하는, c-Myc 발현 또는 활성 억제용 조성물.

### 청구항 11

1) USP47 단백질 또는 이의 단편을 발현하는 시험관 내 모델에 후보물질을 처리하는 단계; 및

2) 상기 모델의 c-Myc 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준을 확인하는 단계

를 포함하는, c-Myc 관련 질병 치료제 스크리닝 방법.

**청구항 12**

청구항 11에 있어서, 상기 USP47 단백질 또는 이의 단편은 USP47의 UCH 도메인, UBL1 도메인 및 UBL2 도메인으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것인, 조성물.

**청구항 13**

청구항 11에 있어서, 상기 c-Myc 단백질 또는 이의 단편은 c-Myc의 bHLH-LZ 도메인을 포함하는 것인, 조성물.

**청구항 14**

청구항 11에 있어서, 상기 방법은

3) 상기 후보물질 처리에 따라 c-Myc 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준이 감소하는 경우, 상기 후보물질을 c-Myc 관련 질병 치료제로 판단하는 단계

를 추가로 포함하는 것인, 방법.

**청구항 15**

USP47 (Ubiquitin-specific protease) 단백질, 이의 단편 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는, c-Myc 관련 질병 진단용 조성물.

**청구항 16**

개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터, USP47 (Ubiquitin-specific protease) 단백질, 이의 단편 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, c-Myc 관련 질병 진단을 위한 정보제공 방법.

## *발명의 설명*

### *기 술 분 야*

[0001] 본 발명은 USP47 단백질 또는 이의 단편의 발현 또는 활성을 억제하는 제제를 포함하는, c-Myc 관련 질병의 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

### *배 경 기 술*

[0002] 세포는 분열, 성장, 분화 그리고 세포사멸 등과 같은 복잡한 과정에 의해 조절되고 있으며 이러한 일련의 조절 과정의 이상으로 비정상적인 세포의 증식이 일어나면서 세포의 암화가 진행된다. 그 중에서도 세포 분열의 이상은 암화의 직접적인 원인으로 생각되어 세포 분열 과정을 조절하는 물질들은 암의 예방 및 치료제 개발의 타깃으로 여겨지고 있다.

[0003] 세포 분열 과정은 G1, S, G2, M기의 세포 주기를 순환 반복하면서 일어나는데, 각 과정마다 체크포인트가 존재하여 세포의 주기를 조절하고 있다. 세포 주기의 조절에 관여하는 단백질들은 추가적으로 인산화와 유비퀴틴화에 의해 그 활성이 조절된다. 유비퀴틴화와 함께 유비퀴틴을 떼어내는 탈유비퀴틴화에 의한 기작도 세포 분열 조절의 중요한 역할을 담당하고 있다.

[0004] 일례로, 탈유비퀴틴화 효소 USP44는 cdc20를 탈유비퀴틴화 시켜 후기 개시(anaphase initiation)를 조절하고(Nature 2007;446:87681), 또 다른 탈유비퀴틴화 효소들인 USP1과 USP7은 DNA 손상 체크포인트(DNA damage checkpoint)를 조절하는 것으로 알려져 있다(Mol Cell 2005;17:3319, Nat Cell Biol 2006;8:33947). 또한 USP7은 Mdm2를 탈유비퀴틴화 시켜 p53의 안정화를 조절하는 것으로 알려져 있으며(Oncogene 2007;26:72626), USP16은 히스톤 H2A를 탈유비퀴틴화 시켜 유사분열(mitosis) 과정 중에 염색체 분리(chromosomal segregation)를 조절하는 것으로 알려져 있다(Nature 2007;449:106872).

[0005] 이러한 배경하에 탈유비퀴틴화 효소 USP47에 의해 암이 조절되는 핵심인자가 c-Myc임을 발굴하였으며, 암의 대표적인 oncogene으로 알려진 c-Myc의 탈유비퀴틴화 조절을 통해 USP47 저해를 통한 암의 치료 효과를 확인하여 본 발명을 완성하였다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0006] 일 양상은 USP47 (Ubiquitin-specific protease 47) 단백질 또는 이의 단편의 발현 또는 활성을 억제하는 제제를 포함하는, c-Myc 관련 질병의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0007] 다른 양상은 USP47 단백질 또는 이의 단편의 발현 또는 활성을 억제하는 제제를 포함하는, c-Myc 발현 또는 활성 억제용 조성물을 제공한다.

[0008] 또 다른 양상은 1) USP47 단백질 또는 이의 단편을 발현하는 시험관 내 모델에 후보물질을 처리하는 단계; 및 2) 상기 모델의 c-Myc 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준을 확인하는 단계를 포함하는, c-Myc 관련 질병 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0009] 또 다른 양상은 USP47 단백질, 이의 단편 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는, c-Myc 관련 질병 진단용 조성물을 제공한다.

[0010] 또 다른 양상은 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터, USP47 단백질, 이의 단편 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, c-Myc 관련 질병 진단을 위한 정보제공 방법을 제공한다.

### 과제의 해결 수단

[0011] 일 양상은 USP47 단백질 또는 이의 단편의 발현 또는 활성을 억제하는 제제를 포함하는, c-Myc 관련 질병의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 명세서에서의 용어 "USP47(Ubiquitin Specific Peptidase 47)"은 탈유비퀴틴화 효소로 DNA polymerase β, β-TrCP, SATB2 등을 조절하여 암화 과정을 조절하는 것으로 알려져 있다. 상기 USP47은 UniProt 번호 Q96K76의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0013] 상기 USP47 단백질 또는 이의 단편은 USP47의 UCH 도메인, UBL1 도메인 및 UBL2 도메인으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것일 수 있으며, 구체적으로 UCH 도메인을 포함하거나, UBL1 도메인 및 UBL2 도메인을 포함하거나, UCH 도메인, UBL1 도메인 및 UBL2 도메인을 포함하는 것일 수 있다.

[0014] 상기 USP47 단백질은 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으며, 구체적으로 상기 서열번호 11의 아미노산 서열과 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상 상동성을 나타내는 것일 수 있으며, 보다 구체적으로 서열번호 11의 아미노산 서열로 구성된 것일 수 있다.

[0015] 상기 UCH 도메인은 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으며, 구체적으로 상기 서열번호 12의 아미노산 서열과 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상 상동성을 나타내는 것일 수 있으며, 보다 구체적으로 서열번호 12의 아미노산 서열로 구성된 것일 수 있다.

[0016] 상기 UBL1 도메인 및 UBL2 도메인을 포함하는 단편은 서열번호 11의 477번째 내지 753번째 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으며, 구체적으로 상기 서열번호 11의 477번째 내지 753번째 아미노산 서열과 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상 상동성을 나타내는 것일 수 있으며, 보다 구체적으로 서열번호 11의 477번째 내지 753번째 아미노산 서열로 구성된 것일 수 있다.

[0017] 본 명세서에서의 용어 "USP47 단백질 또는 이의 단편의 발현 또는 활성을 억제할 수 있는 제제" 또는 "USP47 발현 또는 활성 억제제"란, USP47 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자, mRNA 또는 단백질에 직접 또는 간접적으로 결합하여 USP47 단백질 또는 이의 단편의 발현 또는 활성을 억제할 수 있는 물질을 의미한다. 본 명세서에서, 상기 USP47의 발현 또는 활성을 억제할 수 있는 제제는 USP47의 저해제 또는 USP47의 억제제와 동일한 의미로 사용될 수 있다.

[0018] 상기 USP47 단백질 또는 이의 단편의 발현 또는 활성을 억제할 수 있는 제제는 USP47의 발현 또는 활성을 억제함으로써 c-Myc의 발현 또는 활성을 억제하는 것일 수 있으며, 구체적으로 c-Myc의 분해를 촉진하는 것일 수 있다.

[0019] 상기 c-Myc 단백질은 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으며, 구체적으로 상기 서열번호 15의 아미노산 서열과 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상 상동성을 나타내는 것일 수 있으며, 보다 구체적으로 서열번호 15의 아미노산 서열로 구성된 것일 수 있다.

[0020] 상기 제제는 특별히 이에 제한되지 않으나, 구체적인 예로, USP47 단백질 또는 이의 단편의 발현을 억제할 수 있는 제제는 USP47 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 miRNA, siRNA, shRNA, 안티센스 올리고뉴클레오티드 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 USP47 단백질 또는 이의 단편의 활성을 억제할 수 있는 제제는 USP47의 단백질에 상보적으로 결합할 수 있는 항체, 앱타머, 소분자 화합물(small molecules) 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0021] 본 명세서에서의 용어 "miRNA, siRNA 또는 shRNA"란, RNA 방해 또는 유전자 사일런싱(silencing)을 매개하기 위하여 주로 목적 유전자로부터 전사된 mRNA에 결합하여, 상기 mRNA의 해독을 저해하는 핵산 분자를 의미한다 상기 siRNA 또는 shRNA는 표적 유전자의 발현을 해독수준에서 억제할 수 있기 때문에, 효율적인 유전자 넉다운(knockdown) 방법 또는 유전자치료 방법에 사용될 수 있으며, 본 명세서에서의 목적상, USP47의 발현을 억제하는데 사용될 수 있다.

[0022] 본 명세서에서의 용어 "안티센스 올리고뉴클레오티드"란 특정 mRNA의 서열에 상보적인 핵산 서열을 함유하고 있는 DNA 또는 RNA 또는 이들의 유도체를 의미하는데, mRNA 내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 효과를 나타내며, 본 명세서에서의 목적상, USP의 발현을 억제하는데 사용될 수 있다.

[0023] 본 명세서에서의 용어 "항체"란, 단백질 또는 펩티드 분자의 항원성 부위에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질성 분자를 의미하는데, 이러한 항체는, 각 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현벡터에 클로닝하여 상기 마커 유전자에 의해 코딩되는 단백질을 얻고, 얻어진 단백질로부터 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 본 명세서에 있어서, 상기 항체는 활성화된 USP47 단백질에 결합함으로써, 상기 단백질의 활성을 억제할 수 있는 수단으로 해석될 수 있다. 구체적인 예로, USP47에 특이적으로 결합될 수 있는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이면 그것의 일부도 상기 항체에 포함되고, 모든 면역 글로불린 항체가 포함될 수 있을 뿐만 아니라 인간화 항체 등의 특수 항체를 포함할 수도 있다. 아울러, 상기 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함하는 형태가 될 수도 있다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며 Fab, F(ab'), F(ab') 2 및 Fv 등이 될 수 있다.

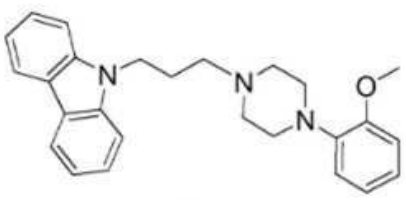
[0024] 본 명세서에서의 용어 "앱타머(aptamer)"란 소정의 표적 분자에 대한 결합 활성을 갖는 핵산 분자를 의미한다. 상기 앱타머는 RNA, DNA, 수식(modified) 핵산 또는 이들의 혼합물일 수 있으며, 직쇄상 또는 환상의 형태일 수 있는데, 대체로, 상기 앱타머를 구성하는 뉴클레오티드의 서열이 짧을수록 화학합성 및 대량 생산이 보다 용이하고, 비용면에서의 장점이 우수하며, 화학수식이 용이하고, 생체 내 안정성이 우수하며, 독성이 낮다고 알려져 있다. 본 명세서에 있어서, 상기 앱타머는 활성화된 USP 단백질에 결합함으로써, 상기 단백질의 활성을 억제할 수 있는 수단으로 해석될 수 있다.

[0025] 본 명세서의 용어 "소분자 화합물(small molecules)"이란, 분자량이 작은 유기 화합물로, 단백질 등의 생체 고분자에 결합하여 그 기능을 조절하는 분자를 의미한다. 천연유래이거나 인공적으로 합성될 수 있으며, 단백질의 기능을 저해하거나 단백질-단백질 상호작용을 방해할 수도 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 명세서의 목적상, 상기 소분자 화합물은 활성화된 USP 단백질의 활성을 억제하는 분자라면 제한 없이 포함하며, 구체적인 예로 활성화된 USP에 결합하여 활성을 억제하는 분자를 의미하나, 이에 제한되지 않는다.

[0026] 상기 USP47 단백질 또는 이의 단편의 발현 또는 활성을 억제하는 제제는 K-552, 이의 약학적으로 허용가능한 염, 이의 수화물, 및 이의 용매화물로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다.

[0027] 본 명세서에서의 용어 "K-552" 또는 "K-552 화합물"은 카바졸 유도체로서, 9-(3-(4-(2-메톡시페닐)피페라진-1-일)프로필)-9H-카바졸로 명명되며, 하기 화학식 1로 표현될 수 있다.

[0028] [화학식 1]

[0029] 


[0030] 본 명세서에서의 용어 "약학적으로 허용가능한 염"이란, 양이온과 음이온이 정전기적 인력에 의해 결합하고 있

는 물질인 염 중에서도 약제학적으로 사용될 수 있는 형태의 염을 의미하는데, 통상적으로 금속염, 유기 염기와의 염, 무기산과의 염, 유기산과의 염, 염기성 또는 산성 아미노산과의 염 등이 될 수 있다. 예를 들어, 금속염으로는 알칼리 금속염(나트륨염, 칼륨염 등), 알칼리 토금속염(칼슘염, 마그네슘염, 바륨염 등), 알루미늄염 등이 될 수 있고; 유기 염기와의 염으로는 트리에틸아민, 피리딘, 피콜린, 2,6-루티딘, 에탄올아민, 디에탄올아민, 트리에탄올아민, 시클로헥실아민, 디시클로헥실아민, N,N-디벤질에틸렌디아민 등과의 염이 될 수 있으며; 무기산과의 염으로는 염산, 브롬화수소산, 질산, 황산, 인산 등과의 염이 될 수 있고; 유기산과의 염으로는 포름산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 프탈산, 푸마르산, 옥살산, 타르타르산, 말레인산, 시트르산, 숙신산, 메탄술폰산, 벤젠술폰산, p-톨루엔술폰산 등과의 염이 될 수 있으며; 염기성 아미노산과의 염으로는 아르기닌, 라이신, 오르니틴 등과의 염이 될 수 있고; 산성 아미노산과의 염으로는 아스파르트산, 글루탐산 등과의 염이 될 수 있다. 특히 바람직한 염으로는, 화합물이 그 내에 산성관능기를 가지는 경우, 알칼리 금속염 (예컨대, 나트륨염, 칼륨염 등), 알칼리 토금속염 (예컨대, 칼슘염, 마그네슘염, 바륨염 등) 등과 같은 무기염, 및 암모늄염과 같은 유기 염이 있으며, 화합물이 그 내에 염기성 관능기를 가지는 경우, 염산, 브롬화수소산, 질산, 황산, 인산 등과 같은 무기산과의 염, 아세트산, 프탈산, 푸마르산, 옥살산, 타르타르산, 말레인산, 시트르산, 숙신산, 메탄술폰산, p-톨루엔술폰산 등과 같은 유기산과의 염이 있다.

[0031] 상기 USP47 단백질 또는 이의 단편의 발현 또는 활성을 억제하는 제제 또는 상기 제제를 포함하는 조성물은 c-Myc의 분해를 촉진하는 것일 수 있으며, 구체적으로 USP47의 c-Myc 탈유비퀴틴화 활성을 억제하여 c-Myc의 유비퀴틴화를 촉진하는 것일 수 있다.

[0032] 본 명세서에서의 용어 "c-Myc(cellular Myc)"은 Myc 패밀리에 속하는 단백질로 전사인자로 작용하며 정상세포에서는 거의 발현하지 않으며 주로 암세포에서 암의 발생, 발달 및 진화에 관여하는 종양형성 인자 (oncogene)로 작용하는 것으로 알려져 있다. 상기 c-Myc은 UniProt 번호 Q6LBK7의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0033] 상기 USP47의 발현 또는 활성을 억제하는 제제 또는 상기 제제를 포함하는 조성물은 c-Myc의 발현 또는 활성을 억제함으로서 c-Myc의 다운스트림 경로의 신호전달 경로의 발현 또는 활성을 억제할 수 있으며, 구체적으로 c-Myc의 표적 유전자로서 CCNE1, LDHA 등의 발현 또는 활성을 억제하는 것일 수 있다.

[0034] 상기 조성물은 K-RAS의 발현 또는 활성을 억제하는 제제를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

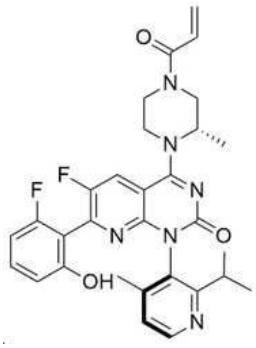
[0035] 본 명세서에서의 용어 "K-RAS (Kirsten rat sarcoma virus, KRAS)"은 포의 증식, 성숙, 사멸 등 세포 신호전달 경로에 관여하는 RAS 단백질 중 하나이다. KRAS 단백질은 신호전달 분자인 GTP와 결합하며 전등의 스위치처럼 '켜짐'과 '꺼짐' 상태를 전환하며 세포의 성장을 조절하지만, KRAS 단백질에 변이가 발생하면 암 관련 세포 성장 신호가 '켜짐' 상태로 지속되면서 암을 유발한다. KRAS 변이는 KRAS G12C, KRAS G12V 및 KRAS G12D 등이 알려져 있다. 상기 K-RAS는 UniProt 번호 P01116의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0036] 상기 K-RAS의 발현 또는 활성을 억제하는 제제는 K-RAS의 야생형 및/또는 돌연변이형 발현 또는 활성을 억제하는 것일 수 있으며, 구체적으로 상기 K-RAS 돌연변이는 K-RAS 야생형을 암호화하는 유전자의 염기서열의 12번째 코돈 위치에서 글리신(G)이 시스테인(C)으로 치환된 돌연변이(KRAS G12C)일 수 있다. 구체적으로 상기 K-RAS 돌연변이를 암호화하는 염기서열은 서열번호 13 또는 서열번호 14의 염기서열일 수 있다.

[0037] 상기 K-RAS의 발현 또는 활성을 억제하는 제제는 소토라십(Sotorasib), 아다그라십 (Adagrasib), GFH925, LY3499446, LY3537982, JDQ443, JAB-21822, YL-15293, ELI-002 7P, HBI-2438, JNJ-74699157, D3S-001, BI 1823911, IBI351, MK-1084, GDC-6036, HS-10370, D-1553 및 GEC255로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것일 수 있으며, 구체적으로 소토라십, 아다그라십, GFH925, LY3499446, LY3537982, JDQ443, GDC-6036 및 D-1553로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다.

[0038] 상기 소토라십(Sotorasib)은 하기 화학식 2로 표현되며, 6-Fluoro-7-(2-fluoro-6-hydroxyphenyl)-1-[4-methyl-2-(1-methylethyl)-3-pyridinyl]-4-[(2*S*)-2-methyl-4-(1-oxo-2-propen-1-yl)-1-piperazinyl]pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-2(1*H*)-one로 명명된다(CAS number: 2252403-56-6).

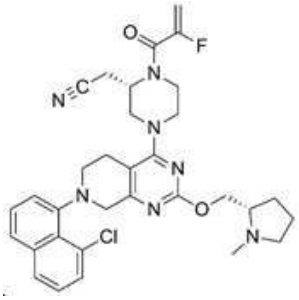
[0039] [화학식 2]



[0040]

[0041] 상기 아다그라십 (Adagrasib)은 하기 화학식 3으로 표현되며, {(2S)-4-[7-(8-chloronaphthalen-1-yl)-2-{[(2S)-1methylpyrrolidin-2-yl]methoxy}-5,6,7,8tetrahydropyrido[3,4-d]pyrimidin-4-yl]-1-(2-fluoroprop2-enoyl)piperazin-2-yl}acetonitrile로 명명된다(CAS number: 2326521-71-3).

[0042] [화학식 3]



[0043]

[0044] 상기 LY3537982은 하기 화학식 4로 표현되며, 4-(2-acryloyl-9-chloro-7-fluoro-5-oxo-2,3,11,11a-tetrahydro-1H,5H-benzo[f]imidazo[5,1-c][1,4]oxazepin-8-yl)-2-amino-7-fluorobenzo[b]thiophene-3-carbonitrile로 명명된다(CAS number: 2414198-64-2).

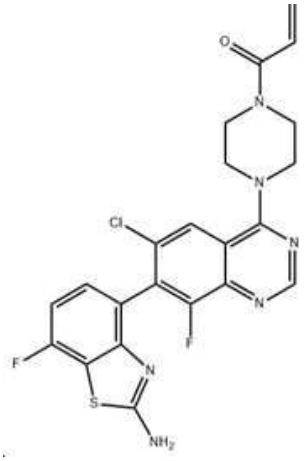
[0045] [화학식 4]



[0046]

[0047] 상기 LY3499446은 하기 화학식 5로 표현되며, 1-[4-[7-(2-amino-7-fluoro-1,3-benzothiazol-4-yl)-6-chloro-8-fluoroquinazolin-4-yl]piperazin-1-yl]prop-2-en-1-one;methanesulfonic acid로 명명된다(CAS number: 2409131-50-4).

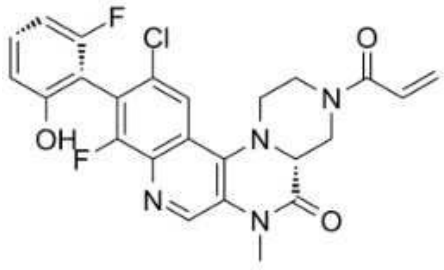
[0048] [화학식 5]



[0049]

[0050] 상기 GFH925은 하기 화학식 6으로 표현되며, (7*R*)-16-chloro-14-fluoro-15-(2-fluoro-6-hydroxyphenyl)-9-methyl-5-prop-2-enoyl-2,5,9,12-tetrazatetracyclo[8.8.0.$0^{2,7}$.$0^{13,18}$]octadeca-1(10),11,13,15,17-pentaen-8-one로 명명된다 (CAS number: 2349393-95-7).

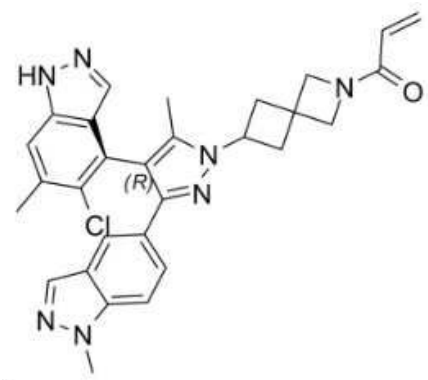
[0051] [화학식 6]



[0052]

[0053] 상기 JDQ443은 하기 화학식 7로 표현되며, (1-[6-[4-(5-chloro-6-methyl-1H-indazol-4-yl)-5-methyl-3-(1-methylindazol-5-yl)pyrazol-1-yl]-2-azaspiro[3.3]heptan-2-yl]prop-2-en-1-one로 명명된다 (CAS number: 2653994-08-0).

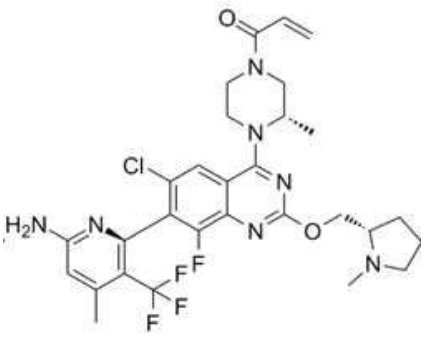
[0054] [화학식 7]



[0055]

[0056] 상기 GDC-6036 (Divarasib)은 하기 화학식 8로 표현되며, 1-[(3*S*)-4-[7-[6-amino-4-methyl-3-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]-6-chloro-8-fluoro-2-[[(2*S*)-1-methylpyrrolidin-2-yl]methoxy]quinazolin-4-yl]-3-methylpiperazin-1-yl]prop-2-en-1-one로 명명된다 (CAS number: 2417987-45-0).

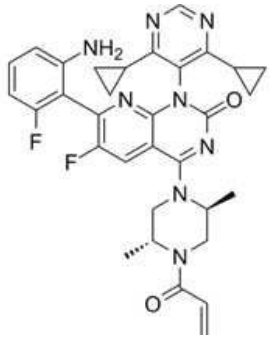
[0057] [화학식 8]



[0058]

[0059] 상기 D-1553 (Garsorasib)은 하기 화학식 9로 표현되며, 7-(2-amino-6-fluorophenyl)-1-(4,6-dicyclopropylpyrimidin-5-yl)-4-[(2S,5R)-2,5-dimethyl-4-prop-2-enoylpiperazin-1-yl]-6-fluoropyrido[2,3-d]pyrimidin-2-one로 명명된다 (CAS number: 2559761-14-5).

[0060] [화학식 9]



[0061]

[0062] 상기 c-Myc 관련 질병은 폐암, 대장암 및 유방암으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것일 수 있으며, 구체적으로 폐암일 수 있다. 또한, 상기 폐암은 비소세포성 폐암일 수 있다.

[0063] 상기 c-Myc 관련 질병은 c-Myc 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 과발현 또는 과활성으로 인해 발병하는 질병을 의미하는 것일 수 있다. 또한, 상기 c-Myc 관련 질병은 USP47 과발현 또는 과활성으로 인해 발병하는 것일 수 있다.

[0064] 상기 조성물은 암 또는 암세포의 성장, 증식, 전이 및 침투로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 억제하는 것일 수 있으며, 구체적으로 c-Myc의 발현 및/또는 활성을 억제하여 암세포의 성장, 증식, 전이 또는 침투를 억제함으로서 폐암, 대장암 및 유방암 등의 질병을 치료 또는 예방하는 것일 수 있다.

[0065] 본 명세서에서의 용어 "치료"는, 본 발명의 조성물의 투여에 의해 c-Myc 관련 질병의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

[0066] 본 명세서에서의 용어 "예방"은, 본 발명의 조성물의 투여에 의해 c-Myc 관련 질병 또는 질병의 발병 가능성이 억제되거나 지연되는 모든 행위를 의미한다.

[0067] 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 상기 "약학적으로 허용 가능한 담체"란 생물체를 자극하지 않으면서, 주입되는 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 의미할 수 있다. 여기서 "약학적으로 허용되는"의 의미는 유효성분의 활성을 억제하지 않으면서 적용(처방) 대상이 적응 가능한 이상의 독성을 지니지 않는다는 의미이다. 상기 약학적 조성물에 사용 가능한 상기 담체의 종류는 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되고 약학적으로 허용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다. 상기 담체의 비제한적인 예로는, 락토스, 덱스트로스, 말토 덱스트린, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 글리세롤, 에탄올, 전분, 아카시아 고무, 알기네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로스, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사 용액, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트,

또는 광물유 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다. 상기 약학적 조성물은 유효성분 이외에 약학적으로 허용되는 담체를 포함하여 당업계에 공지된 통상의 방법으로 투여 경로에 따라 경구용 제형 또는 비경구용 제형으로 제조될 수 있다. 상기 약학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용 액의 형태로 제제화하여 사용될 수 있다.

[0068] 상기 약학적 조성물을 제제화할 경우, 일반적으로 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 또는 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

[0069] 상기 약학적 조성물이 경구용 제형으로 제조될 경우, 적합한 담체와 함께 당업계에 공지된 방법에 따라 분말, 과립, 정제, 환제, 당의정제, 캡슐제, 액제, 겔제, 시럽제, 현탁액, 웨이퍼 등의 제형으로 제조될 수 있다. 이때 약학적으로 허용되는 적합한 담체의 예로서는 락토스, 글루코스, 슈크로스, 덱스트로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨 등의 당류, 옥수수 전분, 감자 전분, 밀 전분 등의 전분류, 셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 에틸셀룰로오스, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스, 하이드록시프로필메틸셀룰로오스 등의 셀룰로오스류, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 마그네슘 스테아레이트, 광물유, 맥아, 젤라틴, 탈크, 폴리올, 식물성유 등을 들 수 있다. 제제화활 경우 필요에 따라 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 및/또는 부형제를 포함하여 제제화할 수 있다.

[0070] 상기 약학적 조성물이 비경구용 제형으로 제조될 경우, 적합한 담체와 함께 당업계에 공지된 방법에 따라 주사제, 경피 투여제, 비강 흡입제 및 좌제의 형태로 제제화될 수 있다. 주사제로 제제화활 경우 적합한 담체로서는 멸균수, 에탄올, 글리세롤이나 프로필렌 글리콜 등의 폴리올 또는 이들의 혼합물을 들 수 있으며, 바람직하게는 링거 용액, 트리에탄올 아민이 함유된 PBS(phosphate buffered saline)나 주사용 멸균수, 5% 덱스트로스 같은 등장 용액 등을 사용할 수 있다. 경피 투여제로 제제화할 경우 연고제, 크림제, 로션제, 겔제, 외용액제, 파스타제, 리니멘트제, 에어롤제 등의 형태로 제제화될 수 있다. 비강 흡입제의 경우 디클로로플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 이산화탄소 등의 적합한 추진제를 사용하여 에어로졸 스프레이 형태로 제제화될 수 있으며, 좌제로 제제화할 경우 그 기제로는 위텝솔(witepsol), 트윈(tween) 61, 폴리에틸렌 글리콜류, 카카오지, 라우린지, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르류, 폴리옥시에틸렌 스테아레이트류, 소르비탄 지방산 에스테르류 등이 사용될 수 있다.

[0071] 상기 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다. 상기 용어 "약학적으로 유효한 양"이란 의학적 치료 또는 예방에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료 또는 예방하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 질환의 중증도, 약물의 활성, 환자의 연령, 체중, 건강, 성별, 환자의 약물에 대한 민감도, 사용된 본 발명 조성물의 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율 치료기간, 사용된 본 발명의 조성물과 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 단독으로 투여하거나 공지된 c-Myc 관련 질병에 대한 치료 효과를 나타내는 것으로 알려진 성분과 병용하여 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하다.

[0072] 상기 약학적 조성물의 투여량은 사용목적, 질환의 중독도, 환자의 연령, 체중, 성별, 기왕력, 또는 유효성분으로서 사용되는 물질의 종류 등을 고려하여 당업자가 결정할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 약학적 조성물은 성인 1인당 약 0.1ng 내지 약 1,000 mg/kg, 바람직하게는 1 ng 내지 약 100 mg/kg로 투여할 수 있고, 본원의 조성물의 투여빈도는 특별히 이에 제한되지 않으나, 1일 1회 투여하거나 또는 용량을 분할하여 수회 투여할 수 있다. 상기 투여량 또는 투여횟수는 어떠한 면으로든 본원의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0074] 다른 양상은 상기 c-Myc 관련 질병 치료 또는 예방용 약학 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 c-Myc 관련 질병 치료 또는 예방 방법을 제공하는 것이다. 상기에서 설명한 내용과 동일한 부분은 상기 방법에도 공히 적용된다.

[0075] 본 명세서에서 사용되는 용어 "개체"는 c-Myc 관련 질병이 발병되거나 발병할 위험이 있는 개, 고양이, 쥐, 가축, 인간 등을 포함하는 포유동물, 조류, 파충류, 양식어류 등을 제한 없이 포함할 수 있으며, 상기 개체는 인간을 제외하는 것일 수 있다.

[0076] 상기 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 이때, 조성물은 액제, 산제, 에어로졸, 주사제, 수액제(링겔), 캡슐제, 환제, 정제, 좌제 또는 패치의 형태로 제형화되어 투여할 수 있다.

상기 c-Myc 관련 질병 예방 또는 치료용 약학 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여도 투여될 수 있다.

[0077] 상기 약학적 조성물은 특별히 이에 제한되지 않으나, 목적하는 바에 따라 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경피패치투여, 경구 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여 등의 경로를 통해 투여 될 수 있다. 다만, 경구 투여 시에는 제형화되지 않은 형태로도 투여할 수 있고, 위산에 의하여 상기 약학 조성물의 유효성분이 변성 또는 분해될 수 있기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화된 형태 또는 경구용 패치형태로 구강내에 투여할 수도 있다. 또한, 상기 조성물은 활성 물질이 표적세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[0079] 또 다른 양상은 USP47의 발현 또는 활성을 억제하는 제제를 포함하는, c-Myc 발현 또는 활성 억제용 조성물을 제공하는 것이다. 상기에서 설명한 내용과 동일한 부분은 상기 조성물에도 공히 적용된다.

[0080] 상기 USP47 단백질 또는 이의 단편의 발현 또는 활성을 억제하는 제제는 K-552, 이의 약학적으로 허용가능한 염, 이의 수화물, 및 이의 용매화물로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다.

[0081] 상기 조성물은 K-RAS의 발현 또는 활성을 억제하는 제제를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0082] 상기 K-RAS의 발현 또는 활성을 억제하는 제제는 K-RAS 야생형 및/또는 돌연변이형의 발현 또는 활성을 억제하는 것일 수 있으며, 구체적으로 KRAS G12C를 억제하는 것일 수 있다.

[0083] 상기 K-RAS의 발현 또는 활성을 억제하는 제제는 Sotorasib, Adagrasib, GFH925, JAB-21822, YL-15293, ELI-002 7P, HBI-2438, JDQ443, JNJ-74699157, D3S-001, BI 1823911, IBI351, MK-1084, LY3499446, JAB-21822, LY3537982, GDC-6036, HS-10370, D-1553 및 GEC255로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다.

[0085] 또 다른 양상은 1) USP47 단백질 또는 이의 단편을 발현하는 시험관 내 모델에 후보물질을 처리하는 단계; 및 2) 상기 모델의 c-Myc 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준을 확인하는 단계를 포함하는, c-Myc 관련 질병 치료제 스크리닝 방법을 제공한다. 상기에서 설명한 내용과 동일한 부분은 상기 방법에도 공히 적용된다.

[0086] 상기 시험관 내 모델은 USP47 단백질 또는 이의 단편을 발현하는 세포일 수 있다. 또한, 상기 시험관 내 모델은 USP47 단백질 또는 이의 단편의 발현 또는 활성이 증가된 세포일 수 있으며, 구체적으로 상기 모델은 음성 대조군 또는 정상군에 비해 USP47 단백질 또는 이의 단편의 발현 또는 활성이 증가되어 과발현 또는 과활성된 것일 수 있다.

[0087] 상기 USP47 단백질 또는 이의 단편의 발현 또는 활성이 증가된 세포는 USP47 단백질 또는 이의 단편의 발현 또는 활성이 증가된 개체로부터 수득하거나, 정상 세포에 USP47 단백질 또는 이의 단편을 과발현 또는 과활성시킴으로서 수득할 수 있다.

[0088] 상기 USP47 단백질 또는 이의 단편은 USP47의 UCH 도메인, UBL1 도메인 및 UBL2 도메인으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것일 수 있으며, 구체적으로 UCH 도메인을 포함하거나, UBL1 도메인 및 UBL2 도메인을 포함하는 단편을 포함하거나, 및/또는 UCH 도메인, UBL1 도메인 및 UBL2 도메인을 포함하는 단편을 포함하는 것일 수 있다.

[0089] 또한, 상기 USP47 단백질 또는 이의 단편은 USP47의 UBL3 도메인 및 UBL4 도메인으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 영역 또는 단편을 포함하지 않는 것일 수 있다.

[0090] 상기 UBL3 도메인을 포함하는 영역 또는 단편은 서열번호 11의 753번째 내지 934번째 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으며, 구체적으로 상기 서열번호 11의 753번째 내지 934번째 아미노산 서열과 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상 상동성을 나타내는 것일 수 있으며, 보다 구체적으로 서열번호 11의 753번째 내지 934번째 아미노산 서열로 구성된 것일 수 있다.

[0091] 상기 UBL4 도메인을 포함하는 영역 또는 단편은 서열번호 11의 934번째 내지 1287번째 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으며, 구체적으로 상기 서열번호 11의 934번째 내지 1287번째 아미노산 서열과 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상 상동성을 나타내는 것일 수 있으며, 보다 구체적으로 서열번

호 11의 934번째 내지 1287번째 아미노산 서열로 구성된 것일 수 있다.

[0092] 상기 UBL3 도메인 및 UBL4 도메인을 포함하는 영역 또는 단편은 서열번호 11의 753번째 내지 1287번째 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으며, 구체적으로 상기 서열번호 11의 753번째 내지 1287번째 아미노산 서열과 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상 상동성을 나타내는 것일 수 있으며, 보다 구체적으로 서열번호 11의 753번째 내지 1287번째 아미노산 서열로 구성된 것일 수 있다.

[0093] 일 구현예에 있어서, 상기 UBL3 도메인 및/또는 UBL4 도메인은 USP47의 UCH 도메인, UBL1 도메인 및 UBL2 도메인의 c-Myc과의 상호작용을 억제하는 것을 확인하였는 바, c-Myc 분해를 유도하는 치료제 스크리닝에 있어서 효율을 감소시킬 수 있다.

[0094] 상기 시험관 내 모델은 c-Myc 단백질 또는 이의 단편을 발현하는 세포일 수 있다. 또한, 상기 시험관 내 모델은 c-Myc 단백질 또는 이의 단편의 발현 또는 활성이 증가된 세포일 수 있으며, 구체적으로 상기 모델은 음성 대조군 또는 정상군에 비해 c-Myc 단백질 또는 이의 단편의 발현 또는 활성이 증가된 것일 수 있다.

[0095] 상기 c-Myc 단백질 또는 이의 단편의 발현 또는 활성이 증가된 세포는 c-Myc 단백질 또는 이의 단편의 발현 또는 활성이 증가된 개체로부터 수득하거나, 정상 세포에 c-Myc 단백질 또는 이의 단편을 과발현 또는 과활성시킴으로서 수득할 수 있다.

[0096] 상기 c-Myc 단백질 또는 이의 단편은 c-Myc의 bHLH-LZ 도메인을 포함하는 것일 수 있다.

[0097] 상기 bHLH-LZ 도메인을 포함하는 영역 또는 단편은 서열번호 15의 354번째 내지 434번째 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으며, 구체적으로 상기 서열번호 15의 354번째 내지 434번째 아미노산 서열과 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상 상동성을 나타내는 것일 수 있으며, 보다 구체적으로 서열번호 15의 354번째 내지 434번째 아미노산 서열로 구성된 것일 수 있다.

[0098] 또한, 상기 bHLH-LZ 도메인은 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으며, 구체적으로 상기 서열번호 16의 아미노산 서열과 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상 상동성을 나타내는 것일 수 있으며, 보다 구체적으로 서열번호 16의 아미노산 서열로 구성된 것일 수 있다.

[0099] 일 구현예에 있어서, 상기 시험관 내 모델은 1) USP47 단백질 또는 이의 단편; 및 2) c-Myc 단백질 또는 이의 단편이 발현되거나 과발현되는 세포일 수 있다.

[0100] 상기 후보물질은 USP47 단백질 또는 이의 단편의 발현 및/또는 활성을 저해하는 제제일 수 있다.

[0101] 상기 방법은 후보 물질 처리에 따라 상기 모델의 USP47 단백질 또는 이의 단편의 발현/활성 수준을 확인하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0102] 상기 방법에 있어서, 3) 상기 후보물질 처리에 따라 c-Myc 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준이 감소하는 경우, 상기 후보물질을 c-Myc 관련 질병 치료제로 판단하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 단계는 상기 후보물질 처리에 따라 c-Myc의 선택적 스플라이싱 수준이 증가하는 경우, 상기 후보물질을 c-Myc 관련 질병 치료제로 판단하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0103] 상기 후보물질은 USP47 단백질 또는 이의 단편과 c-Myc 단백질 또는 이의 단편의 상호작용 및/또는 결합을 저해하는 제제일 수 있다.

[0104] 상기 방법은 2) USP47 단백질 또는 이의 단편과 c-Myc 단백질 또는 이의 단편의 상호작용 및/또는 결합 수준을 확인하는 단계를 포함하는 것일 수 있다.

[0105] 상기 방법에 있어서, 3) 상기 후보물질 처리에 따라 USP47 단백질 또는 이의 단편과 c-Myc 단백질 또는 이의 단편의 상호작용 및/또는 결합 수준이 감소하는 경우, 상기 후보물질을 c-Myc 관련 질병 치료제로 판단하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0106] 상기 후보물질은 USP47 단백질 또는 이의 단편의 탈유비퀴틴화 활성을 저해하는 제제일 수 있다.

[0107] 상기 방법은 2) c-Myc 단백질 또는 이의 단편의 유비퀴틴화 및/또는 탈유비퀴틴화 수준을 확인하는 단계를 포함하는 것일 수 있다.

[0108] 상기 방법에 있어서, 3) 상기 후보물질 처리에 따라 c-Myc 단백질 또는 이의 단편의 유비퀴틴화 수준이 증가하거나 및/또는 탈유비퀴틴화 수준이 감소하는 경우, 상기 후보물질을 c-Myc 관련 질병 치료제로 판단하는 단계를

추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0109] 일 구현예에 있어서, 상기 c-Myc의 발현 및 선택적 탈유비퀴틴화를 확인하는 것은 세포내에서 c-Myc을 pull down assay로 농축한 후 웨스턴 블랏팅을 이용하여 c-Myc의 발현 또는 활성의 증가 및 감소 수준을 확인하는 것일 수 있다.

[0110] 상기 c-Myc 관련 질병은 폐암, 대장암 및 유방암으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것일 수 있으며, 구체적으로 폐암일 수 있다. 또한, 상기 폐암은 비소세포성 폐암일 수 있다.

[0112] 또 다른 양상은 시험관 내(in vitro)에서 암세포에 USP47의 발현 또는 활성을 억제하는 제제를 처리하여 암세포 내 c-Myc의 발현을 감소시키는 방법을 제공한다. 상기에서 설명한 내용과 동일한 부분은 상기 방법에도 공히 적용된다.

[0113] 상기 암세포는 폐암 세포, 유방암 세포 및 대장암 세포로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함할 수 있으며, 구체적으로 폐암 세포일 수 있다.

[0115] 또 다른 양상은 시험관 내(in vitro)에서 암세포에 USP47의 발현 또는 활성을 억제하는 제제를 처리하여 암세포의 c-Myc의 발현을 감소시키는 단계를 포함하는, 암세포의 증식, 전이 또는 침투를 억제하는 방법을 제공한다. 상기에서 설명한 내용과 동일한 부분은 상기 방법에도 공히 적용된다.

[0116] 상기 암세포는 폐암 세포, 유방암 세포 및 대장암 세포로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함할 수 있으며, 구체적으로 폐암 세포일 수 있다.

[0118] 또 다른 양상은 USP47 단백질, 이의 단편 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는, c-Myc 관련 질병 진단용 조성물을 제공한다. 상기에서 설명한 내용과 동일한 부분은 상기 조성물에도 공히 적용된다.

[0119] 상기 조성물은 USP47 단백질, 이의 단편 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 검출 또는 측정함으로서 특정 개체의 c-Myc 관련 질병을 진단하거나 및/또는 예후를 예측할 수 있다.

[0120] 상기 조성물은 USP47 단백질 또는 이의 단편과 c-Myc 단백질 또는 이의 단편의 상호작용 및/또는 결합 수준을 검출 또는 측정함으로서 특정 개체의 c-Myc 관련 질병을 진단하거나 및/또는 예후를 예측할 수 있다.

[0121] 상기 조성물은 USP47 단백질 또는 이의 단편의 탈유비퀴틴화 활성을 검출 또는 측정함으로서 특정 개체의 c-Myc 관련 질병을 진단하거나 및/또는 예후를 예측할 수 있다.

[0122] 본 명세서에서의 용어 "진단"은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상, 진단이란 c-Myc 관련 질병의 발병 여부를 판별하는 것을 의미하는 것일 수 있다.

[0123] 본 명세서에서의 용어 "예후"는 병세의 진행, 회복에 관한 예측을 의미하는 것으로, 전망 내지는 예비적 평가를 말한다. 본 발명의 목적상, 예후란 c-Myc 관련 질병의 치료 후 해당 개체에서 치료 성공 여부, 생존, 재발, 전이, 약물반응성, 내성 등과 같은 여부를 판단하는 것을 의미한다. 즉, 의학적 귀추(예컨대, 장기 생존 가능성, 무병생존율 등)에 대한 예상을 의미하며, 양성적 예후(긍정적 예후) 또는 음성적 예후(부정적 예후)를 포함하며, 상기 음성적 예후는 재발, 종양 성장, 전이, 약 저항성 등의 병의 진행 또는 치명성(mortality)을 포함하고, 양성적 예후는 질병이 없는 상태 등의 질병의 차도, 종양 퇴행 등의 질병의 개선 또는 안정화(stabilization)를 포함한다.

[0124] 본 명세서에서의 용어 "예측"은 의학적 귀추에 대하여 미리 헤아려 짐작하는 것을 의미하며, 본 발명의 목적 상 c-Myc 관련 질병으로 진단받은 환자의 병의 경과(병의 진행, 개선, 암의 재발, 종양 성장, 약 저항성)를 미리 짐작하는 것을 의미하는 것일 수 있다.

[0125] 본 명세서에서의 용어 "발현 수준의 측정"은 특정 단백질(펩타이드) 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 존재 여부, 발현 여부 또는 발현 정도를 측정하는 것으로서, 구체적으로 USP47 단백질, 이의 단편 또는 이를 암호화하는 mRNA 또는 유전자의 발현 수준을 측정하는 것일 수 있다.

[0126] 상기 진단용 조성물을 이용하여 발현 수준을 측정할 수 있는 상기 USP47 단백질 또는 이의 단편은 USP47의 UCH 도메인, UBL1 도메인 및 UBL2 도메인으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것일 수 있으며, 구체적으로 UCH 도메인을 포함하거나, UBL1 도메인 및 UBL2 도메인을 포함하는 단편을 포함하거나, UCH 도메인, UBL1 도메인 및 UBL2 도메인을 포함하는 단편을 포함하는 것일 수 있다.

[0127] 상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 방법은 웨스턴 블랏팅(Western blotting), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radical immunodiffusion), 오우크테로니면역 확산법(Ouchterlony immunodiffusion), 로케트 면역전기영동(rocket immunoeletrophoresis), 면역조직화학염색법(immunohistochemical staining), 면역침전분석법(immunoprecipitation assay), 보체 고정 분석법(complenent Fixation Assay), 면역형광법(immunofluorescence), 면역크로마토그래피법(immunochromatography), FACS 분석법(fluorescenceactivated cell sorter analysis), 단백질 칩 방법(protein chip technology) 또는 바이오센서(biosensor)인 것일 수 있다.

[0128] 상기 mRNA 또는 유전자의 발현 수준을 측정하는 방법은 역전사효소 중합반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사효소 중합효소반응(competitive RT-PCR), 실시간 역전사 효소 중합효소반응(real time quantitative RT-PCR), 정량적 중합효소반응(quantitative RT-PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection method), 노던 블랏팅(Nothern blotting), DNA 칩 방법(DNA chip technology) 또는 바이오센서(biosensor)인 것일 수 있다.

[0129] 본 명세서에서의 용어 "발현 수준을 측정할 수 있는 제제"는 특정 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 확인하기 위하여 사용될 수 있는 분자를 의미하며, 구체적으로 상기 단백질 또는 상기 유전자를 검출 및/또는 증폭할 수 있는 제제를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0130] 상기 "특정 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 검출할 수 있는 제제"는 상기 특정 유전자 또는 단백질에 특이적으로 결합하여 인식할 수 있도록 하거나, 검출하여 증폭시킬 수 있는 제제를 의미하고, "특정 유전자 또는 단백질을 증폭할 수 있는 제제"는 상기 특정 유전자 또는 단백질의 복제를 반복하여 그 수를 증가시킬 수 있는 제제를 의미하며, 예를 들어 상기 유전자를 포함하는 폴리뉴클레오티드를 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머 또는 특이적으로 결합할 수 있는 프로브를 의미하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0131] 상기 진단용 조성물은 USP47 단백질, 이의 단편 또는 이를 암호화하는 mRNA 또는 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브, 뉴클레오티드, 항체, 항체 단편 또는 이의 항원 결합 단편, 리간드, 수용체, 단백질 또는 그 조합을 포함하는 것일 수 있다.

[0133] 또 다른 양상은 상기 c-Myc 관련 질병 진단용 조성물을 포함하는 c-Myc 관련 질병 진단용 키트를 제공하는 것이다. 상기에서 설명한 내용과 동일한 부분은 상기 키트에도 공히 적용된다.

[0134] 상기 키트는 USP47 단백질, 이의 단편 또는 이를 암호화하는 mRNA 또는 유전자의 발현을 검출하거나 발현 수준을 측정함으로서 상기 c-Myc 관련 질병을 진단할 수 있다.

[0135] 상기 키트는 SP47 단백질, 이의 단편 또는 이를 암호화하는 mRNA 또는 유전자의 발현을 검출하거나 발현 수준을 측정하기 위한 프라이머, 프로브 또는 선택적으로 마커를 인지하는 항체 또는 항원 결합능을 유지하는 이의 단편뿐만 아니라, 상기 측정 또는 분석 방법에 적합한 하나 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물 또는 장치가 포함될 수 있다.

[0136] 예를 들어, 폴리뉴클레오티드 또는 유전자의 검출 또는 발현 수준 측정을 위한 c-Myc 관련 질병 진단용 키트는 상기 USP47 단백질 또는 이의 단편을 암호하하는 폴리뉴클레오티드 또는 유전자에 특이적으로 결합하는 1 종 이상의 올리고 뉴클레오티드를 포함할 수 있는데, 상기 유전자 또는 이의 일부 서열에 대응하는 프라이머, 역전사효소, Taq 폴리머레이즈, PCR용 프라이머 및 dNTP를 포함할 수 있으며, 폴리뉴클레오티드 발현 수준을 측정하기 위해 상기 mRNA 또는 유전자의 발현 수준과 관련하여 기술된 측정 방법을 이용한 키트를 이용할 수 있다.

[0137] 또한, 폴리펩타이드 또는 단백질의 검출 또는 발현 수준 측정을 위한 c-Myc 관련 질병 진단용 키트는 상기 USP47 단백질 또는 이의 단편에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항체 단편을 포함할 수 있으며, 폴리펩타이드의 발현 수준을 측정하기 위해 상기 단백질의 발현 수준과 관련하여 기술된 측정 방법을 이용한 키트를 이용할 수 있다.

[0139] 또 다른 양상은 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터, USP47 단백질, 이의 단편 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, c-Myc 관련 질병 진단을 위한 정보제공 방법을 제공하는 것이다. 상기에서 설명한 내용과 동일한 부분은 상기 방법에도 공히 적용된다.

[0140] 본 명세서에서의 용어 "개체"는 c-Myc 관련 질병이 발병되거나 발병될 가능성이 있는 모든 생물체를 의미하며, 구체적인 예로, 개, 고양이, 마우스, 래트, 원숭이, 소, 돼지, 미니돼지, 가축, 인간 등을 포함하는 포유동물, 양식어류 등을 포함할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0141] 본 명세서에서의 용어 "시료"는 상기 개체로부터 유래한 물질을 의미하며, 구체적으로 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액, 소변 등을 포함할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 이들 시료로부터 유전자 및/또는 단백질 시료를 얻을 수 있으며, 유전자 시료는 핵산, 예를 들어, DNA, mRNA, 또는 mRNA로부터 합성되는 cDNA 등을 포함할 수 있으며, 이로부터 특정 유전자/단백질의 발현 수준을 확인할 수 있는 한, 그 종류는 이에 제한되는 것은 아니다.

[0142] 상기 방법은 대조군으로부터 분리된 생물학적 시료로부터, USP47 단백질, 이의 단편 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 상기 개체 및 상기 대조군의 발현 수준을 비교하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0143] 본 명세서에서의 용어 "대조군"은 c-Myc 관련 질병이 발병되지 않은 일반 개체, 비-c-Myc 관련 질병 환자군, 비환자군 등을 의미하는 것일 수 있다.

[0144] 상기 방법은 상기 개체에서의 USP47 단백질, 이의 단편 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이 상기 대조군보다 높은 경우, 상기 개체를 c-Myc 관련 질병이 발병한 것으로 판별하거나 발병 위험을 높은 수준으로 예측하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

## *발명의 효과*

[0145] 일 양상에 따르면, USP47의 발현/활성을 저해하는 조성물을 활용하여 oncogene인 c-Myc의 발현과 그 활성을 저해시킬 수 있는 바, 이를 통해 다양한 암의 치료제 또는 이의 스크리닝에 유용하게 이용할 수 있다.

## *도면의 간단한 설명*

[0146] 도 1의 A는 USP47을 과발현시킨 후 면역침강법을 이용하여 과발현된 USP47과 세포 내 존재하는 c-Myc 단백질의 결합 여부를 확인한 결과를 나타낸 도면이고, B는 과발현된 USP47과 c-Myc 단백질의 결합 여부를 확인한 결과를 나타낸 도면이고, C는 과발현된 야생형 및 돌연변이형 USP47이 과발현된 c-Myc 단백질과의 결합 여부를 확인한 결과를 나타낸 도면이고, D는 세포내 존재하는 USP47와 세포내 c-Myc 단백질과의 결합 여부를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 2는 공초점 현미경을 사용하여 면역 형광으로 염색된 USP47 및 c-Myc 단백질이 세포내에서 공동으로 위치함을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 3의 A는 USP47 단편의 구조에 대한 설명을 나타낸 도면이고, B는 USP47 단백질 또는 단편을 형질주입하여 과발현된 c-Myc 단백질과의 결합 여부를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 4의 A는 c-Myc 단편의 구조에 대한 설명을 나타낸 도면이고, B는 c-Myc 단백질 또는 단편을 형질주입하여 USP47과의 결합 여부를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 5는 USP47의 야생형 또는 돌연변이형(효소 활성이 없음)을 과발현시킨 후, c-Myc의 유비퀴틴화 여부를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 6의 A는 비소세포폐암 세포주인 A549 세포주와 Calu-1 세포주에서 USP47을 과발현시킨 후 USP47의 발현양에 따른 c-Myc의 발현 수준의 변화를 웨스턴 블랏으로 확인한 결과를 나타낸 도면이고, B는 siUSP47 및/또는 프로테아좀 저해제인 MG132 처리 시 c-Myc의 발현 수준의 변화를 웨스턴 블랏으로 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 7의 A는 USP47을 과발현시킨 후 cycloheximide를 처리하고 c-Myc 의 분해 속도를 웨스턴 블랏으로 확인한 결과를 나타낸 도면이고, B는 USP47의 발현을 억제한 후 cycloheximide를 처리하고 c-Myc의 분해 속도를 웨스턴 블랏으로 확인한 결과를 나타낸 도면이고,

도 8의 A는 야생형 또는 돌연변이형의 USP47을 과발현시킨 경우 c-Myc의 유전자 발현을 qRT-PCR로 확인한 결과

를 나타낸 도면이고, B는 siRNA를 이용하여 USP47 발현 저해 후 c-Myc의 다운스트림 유전자들의 발현 수준을 qRT-PCR로 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 9의 A는 A549 세포주에서 USP47 넉다운하거나 USP47 넉다운 후 c-Myc을 과발현시킨 후, 콜로니 형성 어세이 및 웨스턴 블랏팅 결과를 나타낸 도면이고, B는 Calu-1 세포주에서 USP47 넉다운하거나 USP47 넉다운 후 c-Myc을 과발현시킨 후, 콜로니 형성 어세이 및 웨스턴 블랏팅 결과를 나타낸 도면이다.

도 10의 A는 A549 세포주에서 USP47 및/또는 c-Myc 을 각각 억제한 경우, 콜로니 형성 어세이 및 웨스턴 블랏팅 결과를 나타낸 도면이고, B는 Calu-1 세포주에서 USP47 및/또는 c-Myc을 각각 억제한 경우, 콜로니 형성 어세이 및 웨스턴 블랏팅 결과를 나타낸 도면이고,

도 11의 A는 GEO (Gene Expression Omnibus) 데이터베이스를 이용하여 USP47 발현에 따른 폐암환자들의 생존률을 분석한 결과를 나타낸 도면이고, B는 TCGA (The CANCER GENOME ATLAS PROGRAM) 데이터베이스를 이용하여 USP47 발현 정도에 따른 폐암환자들의 생존률을 분석한 결과를 나타낸 도면이다.

도 12의 A는 TCGA-LUAD 데이터베이스를 이용하여 KRAS mRNA 수준에 따라 두 그룹으로 나누어 그룹 간 USP47 mRNA 발현 수준의 차이를 분석한 결과를 나타낸 도면이고 (*** $p < 0.001$), B는 GSE40275 데이터베이스를 이용하여 KRAS mRNA 수준에 따라 두 그룹으로 나누어 그룹 간 USP47 mRNA 발현 수준의 차이를 분석한 결과를 나타낸 도면이다.

도 13의 A는 GSEA_4.3.2 프로그램을 사용하여 GSE26939 데이터 세트에 대해 GSEA 분석을 수행한 결과를 나타내고, B는 KRAS 발현 수준이 다양한 비소세포폐암 세포주에서 USP47의 발현 수준을 분석한 결과를 나타낸다.

도 14의 A는 AMG510 약물에 민감한 H358 폐암 세포주에 AMG510 약물과 USP47의 저해제인 K-552를 병용처리한 경우 세포 생존율을 WST-1 assay를 통하여 확인한 결과이고, B는 상기 결과를 Bliss test를 통해 분석한 결과를 나타낸 도면이다.

도 15의 A는 AMG510 약물에 중간 수준으로 민감한 Calu-1 세포주에 AMG510 약물과 USP47의 저해제인 K-552를 병용처리한 경우 세포 생존율을 WST-1 assay를 통하여 확인한 결과이고, B는 상기 결과를 Bliss test를 통해 분석한 결과를 나타낸 도면이다.

도 16의 A는 AMG510 약물에 중간 수준으로 민감한 HCC-1171 세포주에 AMG510 약물과 USP47의 저해제인 K-552를 병용처리한 경우 세포 생존율을 WST-1 assay를 통하여 확인한 결과이고, B는 상기 결과를 Bliss test를 통해 분석한 결과를 나타낸 도면이다.

도 17은 Calu-1 세포주에 AMG510 및/또는 USP47의 저해제인 K-552를 처리한 경우, 콜로니 형성 어세이 결과를 나타낸 도면이다.

도 18은 HCC-1171 세포주에 AMG510 및/또는 USP47의 저해제인 K-552를 처리한 경우, 콜로니 형성 어세이 결과를 나타낸 도면이다.

도 19의 A는 Calu-1 세포주에 AMG510 및/또는 USP47의 저해제인 K-552를 처리한 경우, 단백질 발현 수준을 웨스턴 블랏팅으로 확인한 결과를 나타낸 도면이고, B는 HCC-1171 세포주에 AMG510 및/또는 USP47의 저해제인 K-552를 처리한 경우, 단백질 발현 수준을 웨스턴 블랏팅으로 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 20의 A는 Calu-1 세포주에 AMG510 및/또는 siUSP47를 처리한 경우, 단백질 발현 수준을 웨스턴 블랏팅으로 확인한 결과를 나타낸 도면이고, B는 HCC-1171 세포주에 AMG510 및/또는 siUSP47를 처리한 경우, 단백질 발현 수준을 웨스턴 블랏팅으로 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0147] 이하 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0149] **실시예 1: 세포 배양**

[0150] 폐암세포주인 A549 세포, H359 세포, Calu-1 세포, 그리고 HEK293T 세포는 한국세포주은행에서 구입하였다. 모든 폐암 세포들은 10% FBS (GenDepot, USA)와 1% 페니실린/스트렙토마이신 (penicillin/streptomycin)

(GenDepot, USA)이 포함된 RPMI-1640 세포배양액 (GenDepot, USA)으로 배양하였다. HEK293T 세포는 10% FBS와 1% 페니실린/스트렙토마이신 (penicillin/streptomycin)이 포함된 DMEM 세포배양액 (GenDepot, USA)으로 배양하였다. 모든 세포는 37 ℃ 온도에서 5% 이산화탄소를 공급하는 배양기 안에서 배양하였다.

[0152] **실시예 2: 웨스턴 블랏 분석 (Western Blot Assay)**

[0153] 각 세포를 수득하여 단백질 용해 버퍼 [20mM Tris-Cl (pH 7.5), 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1% Triton X-100, 2.5mM sodium pyrophosphate, 50mM NaF, 5mM Beta-glycero phosphate, 1mM $Na_3VO_4$, 1X protease inhibitor (cOmplete, EDTA-free; Roche, Basel, Switzerland)]을 이용하여 단백질을 준비하였다. 20 내지 50 μg의 단백질을 6X SDS 샘플 버퍼와 함께 95 ℃에서 5분간 끓여준 후, 8% 겔로 SDS-PAGE로 분리하였다. 겔에 있는 단백질을 니트로셀룰로오즈 막 (Pall Corporation, USA)으로 옮긴 후, 5% 무지방 우유를 이용하여 블락킹하고 일차 항체와 함께 4 ℃에서 하룻밤 동안 인큐베이션하였다. 이 후 막을 이차 항체와 함께 상온에서 1시간 인큐베이션 하고 ECL 용액 (Cytivia, USA)으로 반응시켜 ChemiDoc (ATTO Technology, USA)을 사용하여 시각화하였다. 본 실험에 사용한 일차 항체는 다음과 같다: USP47 (Bethyl Laboratories Inc.), Myc (Santa Cruz Biotechnology), HA (Santa Cruz Biotechnology), and Actin (AB frontier). 이차 항체는 Goat anti-Rabbit과 Goat anti-Mouse (GenDepot, USA)를 사용하였다.

[0155] **실시예 3: 정량적 실시간 PCR (Quantitative real-time PCR)**

[0156] 세포를 수득하여 Trizol(ambion by life science)을 이용하여 RNA를 추출하였다. USP47, c-Myc 및 다운스트림 유전자들의 발현을 확인하기 위해 oligo-dt (Genolution)를 프라이머로 사용하고, ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (TOYOBO, Japan) 를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 정량적 실시간 PCR은 SYBR Green Real-time PCR Master Mix (TOYOBO, Japan)을 사용하여 수행하였다.

[0157] 본 명세서에서 정량적 실시간 PCR을 수행하기 위해 사용한 프라이머의 서열 정보는 하기 표에 기재하였다.

*표 1*

[0158]

| 유전자 | | 서열 (5` - 3`) | 서열 번호 |
|---|---|---|---|
| USP47 | F | ATGGAAGAATCCTGGCACTG | 1 |
| | R | CTGGAAGGGATCCAACTTCA | 2 |
| c-Myc | F | CCACCTCCAGCTTGTACCTG | 3 |
| | R | GAGCAGAGAATCCGAGGACG | 4 |
| LDHA | F | AGGCTACACATCCTGGGCTA | 5 |
| | R | TCTTCAAACGGGCCTCTTCC | 6 |
| CCNE | F | GAACTGTGTCAAGTGGATGGT | 7 |
| | R | CCGCTGCTCTGCTTCTTAC | 8 |
| β-actin | F | CACTCTTCCAGCCTTCCTTCC | 9 |
| | R | CGGACTCGTCATACTCCTGCTT | 10 |

[0160] **실시예 4: 콜로니 형성 반응 (Colony formation)**

[0161] A549 세포에 플라스미드 또는 siRNA를 형질주입한 후, 그 중 500개의 세포만 35 mm 세포 디쉬로 옮긴 후, 10일 동안 배양하였다. 이 후 세포를 4% 포름알데히드와 메탄올로 고정시키고 크리스탈 바이올렛 염색제로 염색하였다.

[0163] **실시예 5: 면역침강법 (Immunoprecipitation)**

[0164] HEK 293T 세포에 플라스미드를 면역 주입한 후, 24시간 뒤 세포에서 단백질을 추출하고, anti-Flag M2 Magnetic beads 혹은 anti-HA Agarose beads(Sigma Aldrich)를 4 ℃에서 4시간 반응시켰다. Flag 단백질 혹은 2X SDS

Sample buffer로 추출하여 웨스턴 블랏 분석을 수행하였다.

[0166] **실시예 6: 면역 형광 공초점 현미경법 Immunofluorescence confocal microscopy)**

[0167] A549 세포를 12-웰 세포 배양용 플레이트에 배양 후 플라스미드를 형질 주입하였다. 24시간 후 4% 포름알데히드로 20분간 고정하고 0.5% 트리톤-X 시약을 10분 간 처리하여싼. 이후 3% BSA로 10분간 블락킹 처리 후 1차 항체를 실온에서 2시간 처리하였다. 이 후 형광물질이 연결된 2차 항체를 실온에서 1시간 처리 후 세포 핵을 DAPI로 10분간 염색하였다. 분석은 Confocal microscopy (Zeiss)로 63X 배율로 수행하였다.

[0169] **실시예 7: 세포 증식 분석법(WST-1 assay)**

[0170] H358, Calu-1, HCC-1171 세포를 96-웰 세포 배양용 플레이트에 각각 8000개(H358), 6000-8000개(Calu-1), 10000개(HCC1171)씩 배양하였다. 24시간 후 USP47 저해제인 K-552와 $KRAS^{G12C}$ 저해제인 sotorasib (AMG510)를 각 웰에 정해진 농도에 따라 처리하였다. 72시간 후, EZ-Cytox (DoGEN, EZ-3000)를 배양액에 희석하여 30분간 배양한 뒤, microplate absorbance reader (Bio-Rad)를 이용하여 450nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

[0172] **제조예 1: 9-(3-브로모헥실)-9H-카바졸 합성**

[0173] 반응용기에 카바졸(2 g, 11.96 mmol)과 1,3-다이브로모프로판(2.8 ml, 17.94 mmol), t-BuOK(1.3 g, 11.96 mmol)를 THF(15 ml)에 녹인 후, 40 ℃에서 10 시간 동안 가열 교반하였다. 반응 종결 후, 용액을 감압 농축시키고 다시 $CH_2Cl_2$로 희석시켰다. 이 용액을 $H_2O$로 씻어주고 무수 $Na_2SO_4$로 건조시킨 후, 여과하였다. 여과액을 감압 농축시켜 농축액을 실리카 겔 관 크로마토그래피(hexane:MC=8:1)로 분리 정제하여 목적 화합물인 9-(3-브로모헥실)-9H-카바졸 2.1 g(6.36 mmol, 53% 수율)을 얻었다.

[0175] **제조예 2: 9-(4-브로모부틸)-9H-카바졸 합성**

[0176] 1,3-다이브로모프로판 대신에 1,4-다이브로모부탄을 사용한 것을 제외하고는 제조예 1과 동일한 방법으로 목적 화합물을 제조하였다.

[0178] **제조예 3: 9-(5-브로모펜틸)-9H-카바졸 합성**

[0179] 1,3-다이브로모프로판 대신에 1,5-다이브로모펜탄을 사용한 것을 제외하고는 제조예 1과 동일한 방법으로 목적 화합물을 제조하였다.

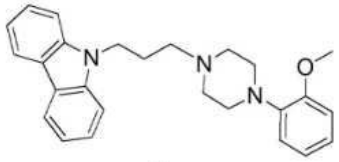
[0181] **제조예 4: 9-(6-브로모헥실)-9H-카바졸 합성**

[0182] 1,3-다이브로모프로판 대신에 1,6-다이브로모헥산을 사용한 것을 제외하고는 제조예 1과 동일한 방법으로 목적 화합물을 제조하였다.

[0184] **제조예 5: 화합물 1(K-552) 합성**

[0185] 제조예 1에 따라 제조된 9-(3-브로모헥실)-9H-카바졸(176 mg, 0.61 mmol), 1-(2-메톡시페닐)피페라진(0.13 ml, 0.73 mmol)을 아세토나이트릴(10 ml)에 녹이고 40 ℃에서 다음날까지 가열환류하였다. 반응 완결 후 반응 혼합물을 $CH_2Cl_2$로 묽힌 후, $H_2O$를 넣고 수층을 $CH_2Cl_2$로 추출하여 얻은 유기층을 무수 $Na_2SO_4$로 건조시킨 후, 여과하였다. 여과액을 감압 농축시켜 농축액을 실리카겔 관 크로마토그래피(MC:MeOH=20:1)로 분리 정제하여, 하기 화학식 1로 표현되는 목적 화합물인 9-(3-(4-(2-메톡시페닐)피페라진-1-일)프로필)-9H-카바졸 145.8 mg(0.36 mmol, 60 % yield)을 얻었다.

[0186] [화학식 1]



1

[0187]

[0188] $^1$H NMR(400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.07(d, J=7.7 Hz, 2H), 7.46-7.41(m, 4H), 7.24-7.15(m, 3H), 7.08-7.03(m, 1H), 6.94(dd, J=6.0 Hz, J=1.4 Hz, 1H), 6.85(td, J=7.6 Hz, J=1.5 Hz, 1H), 4.36(t, J=6.6 Hz, 2H), 2.85(t, J=4.7 Hz, 4H), 2.47(brs, 4H), 2.30(t, J=6.7 Hz, 2H), 2.01(quint, J=6.6 Hz, 2H).

[0190] **실험예 1: USP47과 c-Myc의 결합 여부 확인**

[0191] USP47과 c-Myc이 세포 내 또는 생체 내에서 상호작용하여 결합하는 지 확인하기 위해, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0192] 구체적으로, 실시예 5에 기재된 면역침강법을 이용하여 세포 내에서 USP47과 c-Myc이 결합할 수 있는지 여부를 확인하였다.

[0193] 먼저, HEK 293T 세포에 USP47을 발현하는 플라스미드를 형질도입하여 USP47을 과발현시킨 후, 면역침강법을 이용하여 과발현된 USP47과 세포 내 존재하는 c-Myc 단백질의 결합 여부를 확인한 결과, USP47과 c-Myc이 결합한 상태로 존재하는 것을 확인하였다 (도 1A).

[0194] 다음으로, HEK 293T 세포에 USP47을 발현하는 플라스미드 및 c-Myc을 발현하는 플라스미드를 형질도입하여 USP47 및 c-Myc을 과발현시킨 후, 면역침강법을 이용하여 과발현된 USP47과 과발현된 c-Myc의 결합 여부를 확인한 결과, USP47과 c-Myc이 결합한 상태로 존재하는 것을 확인하였다 (도 1B).

[0195] 다음으로, HEK 293T 세포에 USP47 야생형 또는 돌연변이형을 발현하는 플라스미드 및 c-Myc을 발현하는 플라스미드를 형질도입하여 USP47 야생형 또는 효소활성이 없는 돌연변이형($USP47^{C109S}$)과 c-Myc을 과발현시킨 후, 면역침강법을 이용하여 과발현된 USP47 야생형 또는 돌연변이형과 과발현된 c-Myc의 결합 여부를 확인한 결과, USP47 야생형 및 돌연변이형 모두 c-Myc이 결합한 상태로 존재하는 것을 확인하였다 (도 1C).

[0196] 다음으로, HEK 293T 세포 내 존재하는 USP47 및 c-Myc의 결합 여부를 면역침강법을 이용하여 확인한 결과, 세포 내 존재하는 USP47 및 c-Myc 또한 상호작용하여 결합하는 것을 확인하였다 (도 1D).

[0197] 다음으로, A549 세포에 USP47을 발현하는 플라스미드 및 c-Myc을 발현하는 플라스미드를 형질도입하여 USP47 및 c-Myc을 과발현시킨 후, USP47 및 c-Myc을 면역형광으로 염색시킨 후, 실시예 6에 기재된 면역 형광 공초점 현미경법을 이용하여 세포 내 위치를 확인한 결과, USP47 및 c-Myc이 세포질과 핵 인에서도 공동 위치함을 확인하였다 (도 2).

[0198] 상기 결과들을 토대로, USP47 및 c-Myc은 세포내에서 결합하여 상호작용하는 것을 알 수 있다.

[0200] **실험예 2: USP47과 c-Myc의 상호작용과 관련된 영역 확인**

[0201] USP47과 c-Myc의 세포 내 상호작용과 관련하여, 상기 상호작용에서 중요하게 작용하는 영역을 확인하기 위해, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0202] 먼저, USP47의 일부 영역이 절단된 다양한 단편을 제조하였으며 (도 3A), 상기 USP47 단편과 c-Myc의 상호작용 여부를 면역침강법을 이용하여 확인하였다. 그 결과, UBL 1 및 UBL 2 도메인 또는 UCH 도메인을 포함하는 단편이 USP27 전장 단백질보다 c-Myc과의 결합이 현저히 우수한 것을 확인하였는 바, UBL1 및 UBL2 도메인뿐만 아니라, USP47의 효소 활성을 나타내는 UCH 도메인이 c-Myc과의 상호작용에 관여하는 것임을 알 수 있다. 또한, UBL3 및 UBL4 도메인을 포함하는 단편이 c-Myc과 약한 상호작용을 나타내고 있음에도 불구하고, UBL1 내지 3 도메인 또는 UBL1 내지 4 도메인을 포함하는 단편의 경우, c-Myc과의 상호작용을 나타내지 않는 것을 확인하였는

바, UBL3 및 UBL4 도메인은 UBL1 및 UBL2 도메인의 c-Myc에 대한 상호작용을 오히려 억제하는 것을 알 수 있다 (도 3B).

[0203] 다음으로, c-Myc의 일부 영역이 절단된 다양한 단편을 제조하였으며 (도 4A), 상기 c-Myc 단편과 USP47의 상호작용 여부를 HA 아가로즈 비드를 이용한 면역침강법을 이용하여 확인하였다. 그 결과, c-Myc의 C-말단 단편이 USP47과의 상호작용에 중요하게 작용하는 영역임을 확인하였다 (도 4B).

[0204] 상기 USP47 및 c-Myc의 전장 아미노산 서열을 하기 표에 기재하였다.

*표 2*

[0205]

| 단백질 | 서열 | 서열 번호 |
|---|---|---|
| USP47 | MVPGEENQLVPKEAPLDHTSDKSLLDANFEPGKKNFLHLTDKDGEQPQILLEDSSAGEDSVHDRFIGPLPREGSGGST<br>SDYVSQSYSYSSILNKSETGYVGLVNQAMTCYLNSLLQTLFMTPEFRNALYKWEFEESEEDPVTSIPYQLQRLFVLLQ<br>TSKKRAIETTDVTRSFGWDSSEAWQQHDVQELCRVMFDALEQKWKQTEQADLINELYQGKLKDYVRCLECGYEGWRID<br>TYLDIPLVIRPYGSSQAFASVEEALHAFIQPEILDGPNQYFCERCKKKCDARKGLRFLHFPYLLTLQLKRFDFDYTTM<br>HRIKLNDRMTFPEELDMSTFIDVEDEKSPQTESCTDSGAENEGSCHSDQMSNDFSNDDGVDEGICLETNSGTEKISKS<br>GLEKNSLIYELFSVMVHSGSAAGGHYYACIKSFSDEQWYSFNDQHVSRITQEDIKKTHGGSSGSRGYYSSAFASSTNA<br>YMLIYRLKDPARNAKFLEVDEYPEHIKNLVQKERELEEQEKRQREIERNTCKIKLFCLHPTKQVMMENKLEVHKDKTL<br>KEAVEMAYKMMDLEEVIPLDCCRLVKYDEFHDYLERSYEGEEDTPMGLLLGGVKSTYMFDLLLETRKPDQVFQSYKPG<br>EVMVKVHVVDLKAESVAAPITVRAYLNQTVTEFKQLISKAIHLPAETMRIVLERCYNDLRLLSVSSKTLKAEGFFRSN<br>KVFVESSETLDYQMAFADSHLWKLLDRHANTIRLFVLLPEQSPVSYSKRTAYQKAGGDSGNVDDDCERVKGPVGSLKS<br>VEAILEESTEKLKSLSLQQQQDGDNGDSSKSTETSDFENIESPLNERDSSASVDNRELEQHIQTSDPENFQSEERSDS<br>DVNNDRSTSSVDSDILSSSHSSDTLCNADNAQIPLANGLDSHSITSSRRTKANEGKKETWDTAEEDSGTDSEYDESGK<br>SRGEMQYMYFKAEPYAADEGSGEGHKWLMVHVDKRITLAAFKQHLEPFVGVLSSHFKVFRVYASNQEFESVRLNETLS<br>SFSDDNKITIRLGRALKKGEYRVKVYQLLVNEQEPCKFLLDAVFAKGMTVRQSKEELIPQLREQCGLELSIDRFRLRK<br>KTWKNPGTVFLDYHIYEEDINISSNWEVFLEVLDGVEKMKSMSQLAVLSRRWKPSEMKLDPFQEVVLESSSVDELREK<br>LSEISGIPLDDIEFAKGRGTFPCDISVLDIHQDLDWNPKVSTLNVWPLYICDDGAVIFYRDKTEELMELTDEQRNELM<br>KKESSRLQKTGHRVTYSPRKEKALKIYLDGAPNKDLTQD | 11 |
| c-Myc | MPLNVSFTNRNYDLDYDSVQPYFYCDEEENFYQQQQQSELQPPAPSEDIWKKFELLPTPPLSPSRRSGLCSPSYVAVT<br>PFSLRGDNDGGGGSFSTADQLEMVTELLGGDMVNQSFICDPDDETFIKNIIIQDCMWSGFSAAAKLVSEKLASYQAAR<br>KDSGSPNPARGHSVCSTSSLYLQDLSAAASECIDPSVVFPYPLNDSSSPKSCASQDSSAFSPSSDSLLSSTESSPQGS<br>PEPLVLHEETPPTTSSDSEEEQEDEEEIDVVSVEKRQAPGKRSESGSPSAGGHSKPPHSPLVLKRCHVSTHQHNYAAP<br>PSTRKDYPAAKRVKLDSVRVLRQISNNRKCTSPRSSDTEENVKRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKA<br>PKVVILKKATAYILSVQAEEQKLISEEDLLRKRREQLKHKLEQLRNSCA | 15 |

[0207] **실험예 3: USP47의 c-Myc 안정화 효능 평가**

[0208] USP47이 c-Myc과 상호작용함으로서 c-Myc의 분해를 억제하여 안정화시키는 지 확인하기 위해, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0209] 먼저, c-Myc에서 USP47에 의한 탈유비퀴틴화(deubiquitination) 활성을 확인하기 위해 Ni-NTA 풀다운 분석을 수행하였다. 그 결과, USP47의 존재하에 c-Myc의 유비퀴틴화는 감소되었으며, c-Myc과의 결합능이 있는 것으로 확인된 효소활성이 없는 돌연변이형($USP47^{C109S}$)은 c-Myc의 유비퀴틴화를 감소시키지 못하는 것을 확인하였다 (도 5).

[0210] 다음으로, A549 및 Calu-1 세포주에서 USP47을 과발현시키는 경우, 농도의존적으로 c-Myc의 발현 수준이 증가하는 것을 확인하였고 (도 6A), 반면에 USP47을 억제할 경우 c-Myc 단백질의 발현 수준은 감소되는 것을 확인하였다. 또한, 프로테아좀 억제제인 MG132를 처리할 경우 c-Myc 단백질의 발현 수준은 다시 회복되는 것을 확인하였다 (도 6B).

[0211] 다음으로, USP47이 c-Myc 단백질 안정성에 미치는 영향을 추가로 확인하기 위해, A549 세포에 사이클로헥시미드(cycloheximide)를 처리하고 시간 경과에 따른 c-Myc 단백질의 발현 수준을 평가하였다. 그 결과, USP47을 과발현시킨 세포주의 경우 c-Myc 단백질의 안정화를 유도하였음을 확인하였으며 (도 7A), 반면에 USP47를 억제할 경우 c-Myc 의 분해를 가속화하였음을 확인하였다 (도 7B).

[0212] 다음으로, USP47이 c-Myc의 mRNA 수준에 미치는 영향을 조사한 결과, USP47에 의해 c-Myc의 mRNA 발현 수준 자체에는 유의한 변화를 유도하지 않았음을 확인하였는 바(도 8A), USP47이 탈유비퀴틴화를 통해 프로테오좀에 의

한 분해를 방해함으로서 c-Myc의 단백질 발현 수준을 조절하는 것임을 알 수 있다.

[0213] 다음으로, USP47이 c-Myc을 전사 인자로서 조절하는 역할을 하는지 확인하기 위해, siUSP47(5`-TGAAAAGGGATGTGCAAAA-3`, 서열번호 17) 처리 후 c-Myc 및 이의 다운스트림 유전자의 mRNA 수준을 확인하였다. 그 결과, USP47에 의해 c-Myc의 다운스트림 유전자 중 CCNE1(cyclin E1) 및 LDHA (lactate dehydrogenase A)만이 유의미하게 영향을 받았으며, 다른 유전자들은 크게 영향을 받지 않은 것을 확인하였다 (도 8B).

[0214] 상기 결과들을 종합해보면, USP47은 종양단백질 c-Myc의 안정화에 관여하며, c-Myc의 탈유비퀴틴화를 통해 다운스트림 활성을 조절할 수 있음을 알 수 있다.

[0216] **실험예 4: USP47 억제에 따른 폐암 세포 증식 억제 효능 평가**

[0217] USP47의 억제가 c-Myc 단백질 수준을 조절하여 비소세포폐암 등과 같은 폐암 세포 증식에 영향을 미치는 지 확인하기 위해, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0218] 구체적으로, 폐암 세포의 증식능을 확인하기 위해 실시예 4에 기재된 콜로니 형성 반응을 이용하였다. 먼저, A549 및 Calu-1 세포주에 siUSP47을 처리하여 USP47의 발현 수준을 억제한 결과, 콜로니 형성이 억제되는 것을 확인하였으며, c-Myc을 과발현시키는 경우, 상기 콜로니가 증식하는 것을 확인하였다 (도 9A 및 B). 반대로, c-Myc이 억제된 경우에는 USP47의 발현 수준을 억제하여도 콜로니 형성이 더 이상 감소되지 않았음을 확인하였다 (도 10A 및 B). 상기 결과를 토대로, USP47이 c-Myc 단백질의 발현 수준을 조절함으로서 폐암 세포의 증식을 억제하는 것임을 알 수 있다.

[0219] 다음으로, 비소세포폐암 환자에서 USP47 발현 수준과 생존율의 상관 관계를 확인하기 위해, 생물정보학적 분석을 수행했다. GEO 데이터 세트(accession number GSE26939)를 확인한 결과, USP47의 높은 발현 수준을 보이는 환자 그룹의 전체 생존율이 상당히 낮은 것을 확인하였다(도 11A). 또한, TCGA 데이터 세트 분석 결과도 상기와 동일한 결과를 나타냈다(도 11B). 상기 결과를 토대로, USP47이 비소세포폐암 환자의 생존율 감소에 기여하는 요인이며, USP47을 표적으로 치료법을 진행하는 것이 비소세포폐암의 치료를 위한 잠재적인 치료적 접근법으로서 가능성이 있음을 알 수 있다.

[0221] **실험예 5: USP47과 KRAS 신호전달 경로와의 연관성 확인**

[0222] 종양단백질로 알려진 KRAS는 폐암에서 자주 과발현되고 돌연변이되며, KRAS 돌연변이는 비소세포폐암의 약 25%를 차지하는 것으로 알려져 잇다. 이에, KRAS와 USP47의 연관성을 확인하기 위해, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0223] 먼저, TCGA 및 GEO의 데이터 세트를 분석한 결과, KRAS mRNA 발현이 높은 그룹이 낮은 KRAS 그룹에 비해 USP47 mRNA 수준이 더 높은 것으로 확인되었으며, USP47과 KRAS mRNA 발현 수준 사이에는 통계적으로 유의한 양의 상관관계가 있음을 확인하였다 (p-값 < 0.0001)(도 12A 및 B).

[0224] 다음으로, GSEA(gene set enrichment analysis) 분석 결과에서도 비소세포폐암에서 USP47이 상향 조절된 KRAS 신호 전달 경로와 양의 상관관계를 나타내는 것을 확인하였다 (도 13A).

[0225] 다음으로, 다양한 유형의 비소세포폐암 세포주에서의 USP47 발현 수준을 웨스턴 블랏팅을 이용하여 확인하였다. 그 결과, 야생형 KRAS가 발현하는 것으로 알려진 비소세포폐암 세포주인 H1650과 비교하여, KRAS 돌연변이가 발현되는 세포주에서 USP47 발현이 증가했음을 확인하였다 (도 13B).

[0226] 상기 결과를 종합해보면, 발암성 KRAS-돌연변이 폐암에서 USP47의 발현 수준이 높음을 알 수 있는 바, 발암성 KRAS와 USP47을 모두 표적으로 하는 치료법이 비소세포폐암 환자의 치료를 위한 보다 효과적인 전략이 될 수 있음을 알 수 있다.

[0228] **실험예 6: USP47 억제제와 KRAS 억제제의 병용 처리에 따른 생존율 억제 효능 평가**

[0229] 상기 실험예 5에서 확인한 USP47과 KRAS의 상관관계를 고려하여, KRAS 돌연변이가 발현되는 세포주에서 KRAS 억제제 및 USP47 억제제의 병용 처리에 따른 세포 생존율 억제 효능을 평가하기 위해, 하기와 같은 실험을 수행하

였다.

[0230] 먼저, KRAS G12C 돌연변이를 발현하는 비소세포폐암 세포주인 H358, Calu-1 또는 HCC1171에 KRAS G12C 억제제인 소토라십(Sotorasib, AMG510) 및 USP47 억제제인 K-552(화학식 1의 화합물)를 처리하였다. 그 결과, 소토라십 및 K-552 처리에 따라 농도의존적으로 세포 생존율이 유의미하게 감소되는 것을 확인하였으며(도 14A, 15A 및 16A), 이러한 시너지 효과는 Bliss 시너지 점수를 이용하여 확인하였다 (도 14B, 15B 및 16B).

[0231] 다음으로, 상기 KRAS 억제제 및 USP47 억제제의 병용 처리에 따른 세포 생존율 억제 효능을 보다 자세히 평가하기 위해, Calu-1 및 HCC1171 세포주에서 KRAS G12C 억제제인 소토라십 및/또는 USP47 억제제인 K-552를 처리한 후 콜로니 형성 분석을 수행하였다. 그 결과, 소토라십 또는 K-552를 단일 처리한 경우에도 콜로니 형성이 감소되었으나, 소토라십 및 K-552를 병용 처리한 경우 콜로니 형성이 현저히 감소되는 것을 확인하였다(도 17 및 18).

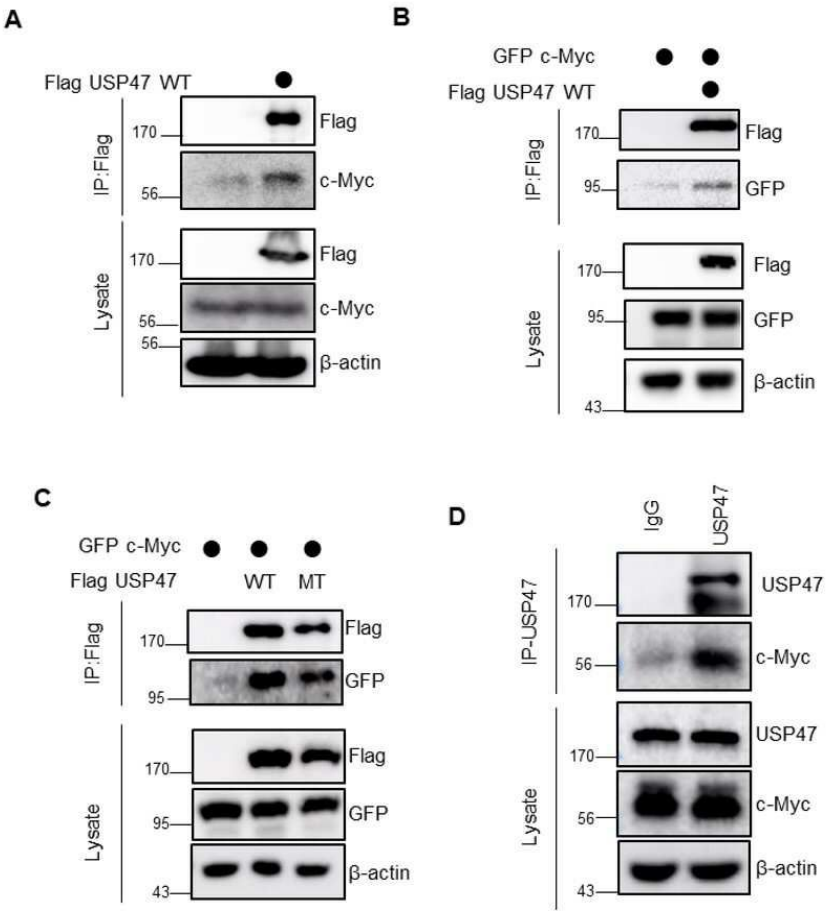
[0232] 다음으로, 상기 KRAS 억제제 및 USP47 억제제의 병용 처리에 따른 효능을 추가로 평가하기 위해, pERK 및 c-Myc의 발현 수준을 확인하였다. 그 결과, 소토라십 또는 K-552를 단일 처리한 경우 pERK 및 c-Myc의 발현 수준이 감소하였으며, 소토라십 및 K-552를 병용 처리한 경우에는 pERK 및 c-Myc의 발현 수준이 현저히 감소하는 것을 확인하였다 (도 19A 및 B). 상기 결과를 토대로, KRAS 억제제 및 USP47 억제제의 병용 처리는 pERK 및 c-Myc의 발현 수준을 감소시키는 기전을 토대로 폐암 치료 효과를 나타낼 수 있음을 알 수 있다.

[0233] 다음으로, 상기 pERK 및 c-Myc의 발현 수준에 대한 KRAS 억제제 및 USP47 억제제의 병용 처리 효과가 USP47의 발현 수준 억제에 의해 매개되는 것임을 확인하기 위해, siUSP47를 처리하여 USP47의 발현 수준을 억제시키고 KRAS 억제제를 처리하였다. 그 결과, siRNA를 사용한여 USP47의 발현 수준을 억제할 경우 c-Myc의 발현 수준을 감소시켰으며, siUSP47이 처리된 세포에 소토라십을 처리할 경우 c-Myc 및 pERK 발현 수준은 단독 처리한 경우보다 현저히 감소되는 것을 확인하였다 (도 20A 및 B).

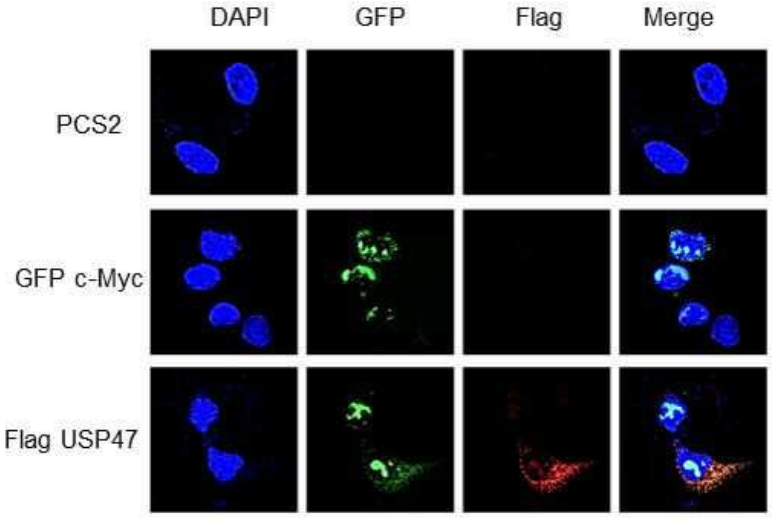
[0235] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

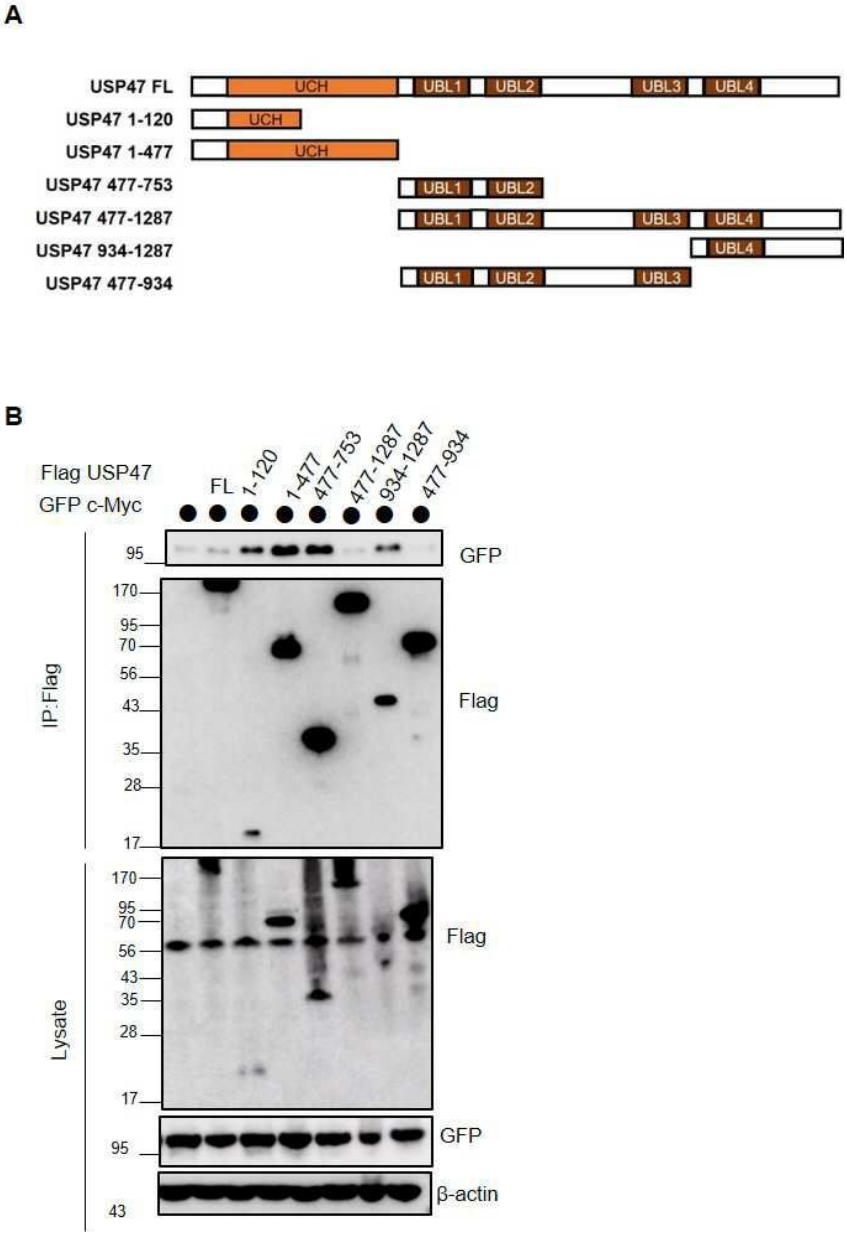
도면1


A
Flag USP47 WT
IP:Flag
170
56
Flag
c-Myc
Lysate
170
56
56
Flag
c-Myc
β-actin
B
GFP c-Myc
Flag USP47 WT
IP:Flag
170
95
Flag
GFP
Lysate
170
95
43
Flag
GFP
β-actin
C
GFP c-Myc
Flag USP47
WT
MT
IP:Flag
170
95
Flag
GFP
Lysate
170
95
43
Flag
GFP
β-actin
D
IgG
USP47
IP-USP47
170
56
USP47
c-Myc
Lysate
170
56
43
USP47
c-Myc
β-actin

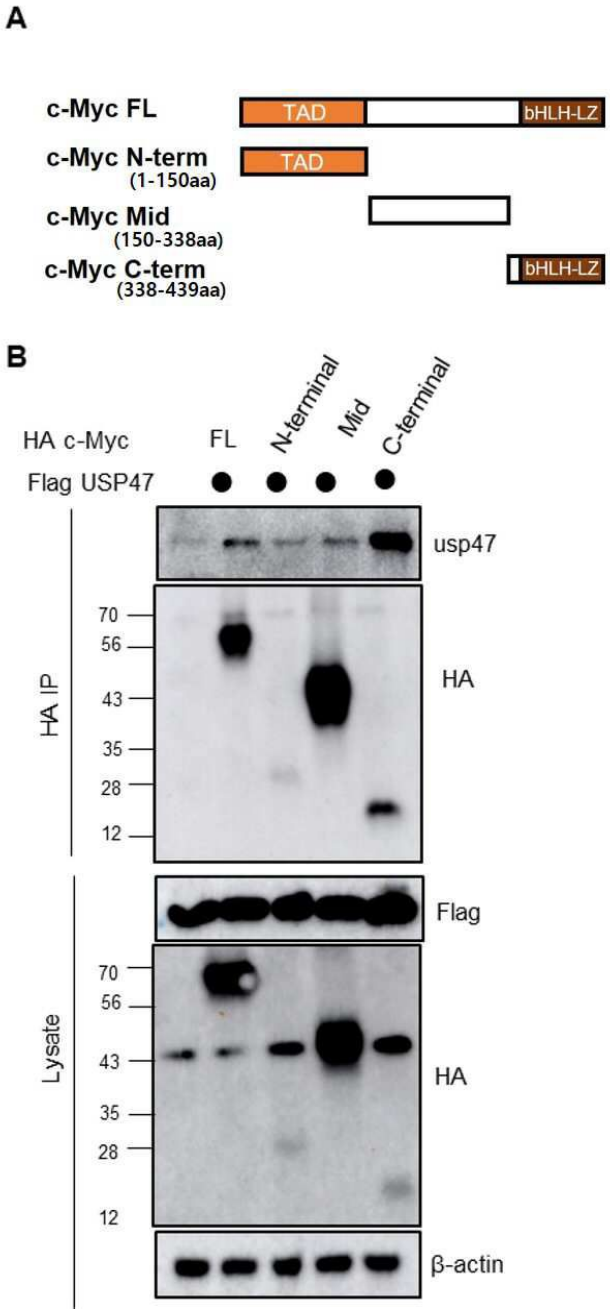
도면2


DAPI
GFP
Flag
Merge
PCS2
GFP c-Myc
Flag USP47

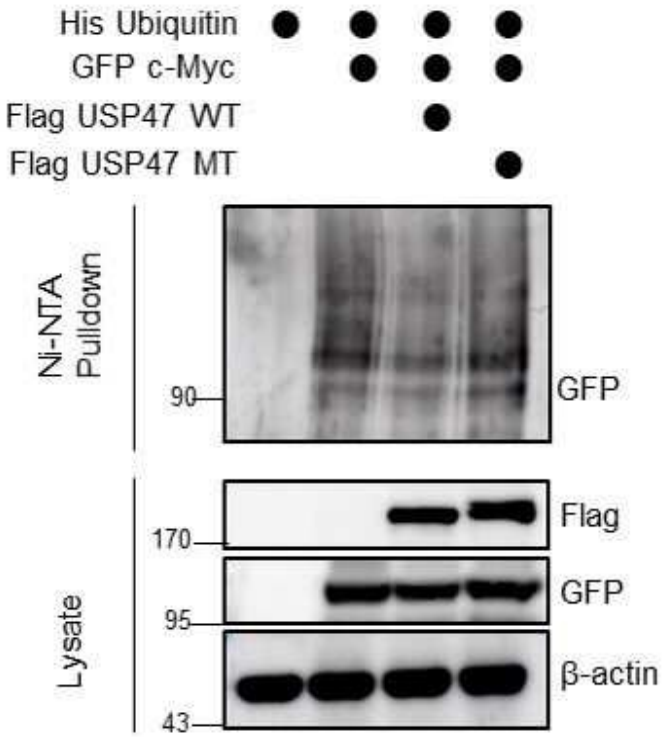
도면3


A
USP47 FL
USP47 1-120
USP47 1-477
USP47 477-753
USP47 477-1287
USP47 934-1287
USP47 477-934
UCH
UBL1
UBL2
UBL3
UBL4
B
Flag USP47
GFP c-Myc
FL
1-120
1-477
477-753
477-1287
934-1287
477-934
IP:Flag
Lysate
GFP
Flag
β-actin
95
170
70
56
43
35
28
17

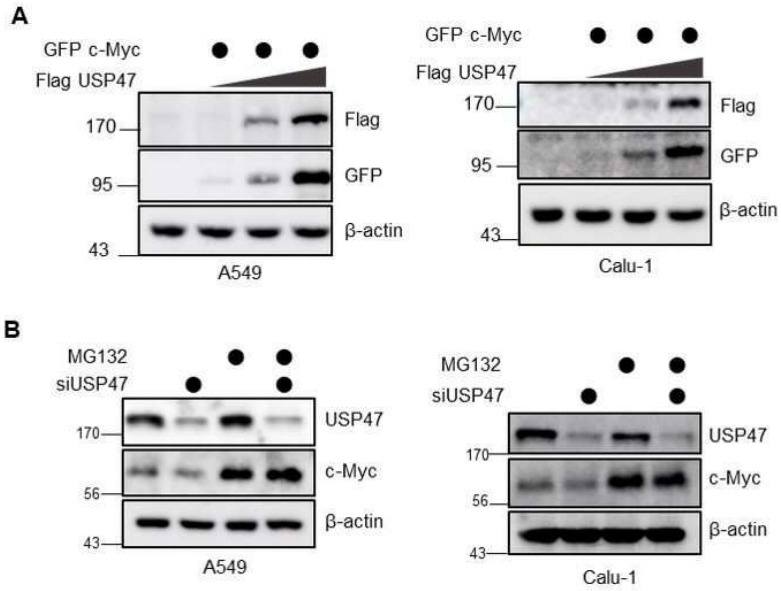
도면4


A
c-Myc FL
TAD
bHLH-LZ
c-Myc N-term
(1-150aa)
TAD
c-Myc Mid
(150-338aa)
c-Myc C-term
(338-439aa)
bHLH-LZ
B
HA c-Myc
FL
N-terminal
Mid
C-terminal
Flag USP47
usp47
HA IP
70
56
43
35
28
12
HA
Flag
Lysate
70
56
43
35
28
12
HA
β-actin

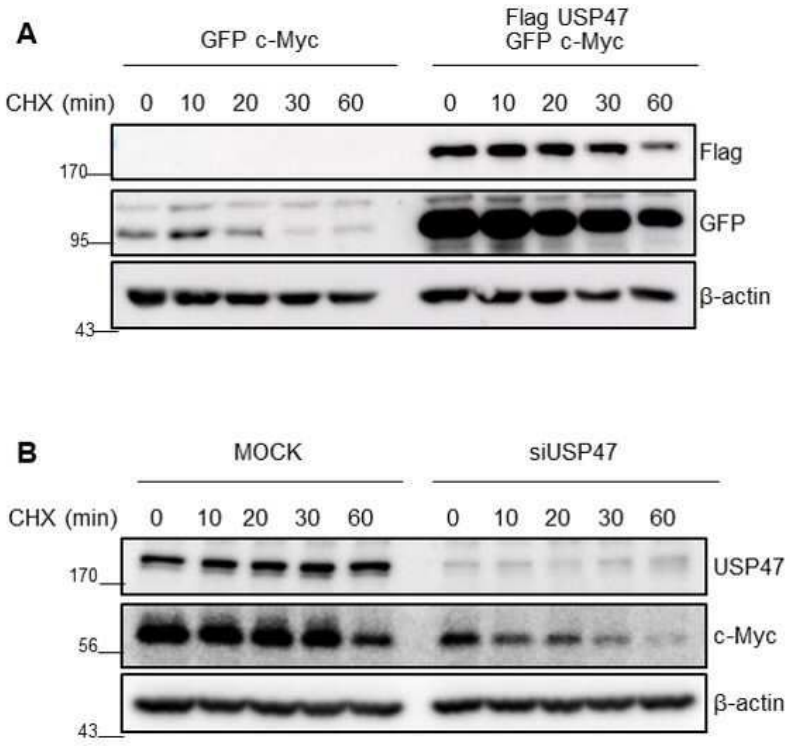
도면5


His Ubiquitin
GFP c-Myc
Flag USP47 WT
Flag USP47 MT
Ni-NTA Pulldown
90
GFP
Lysate
170
Flag
95
GFP
43
β-actin

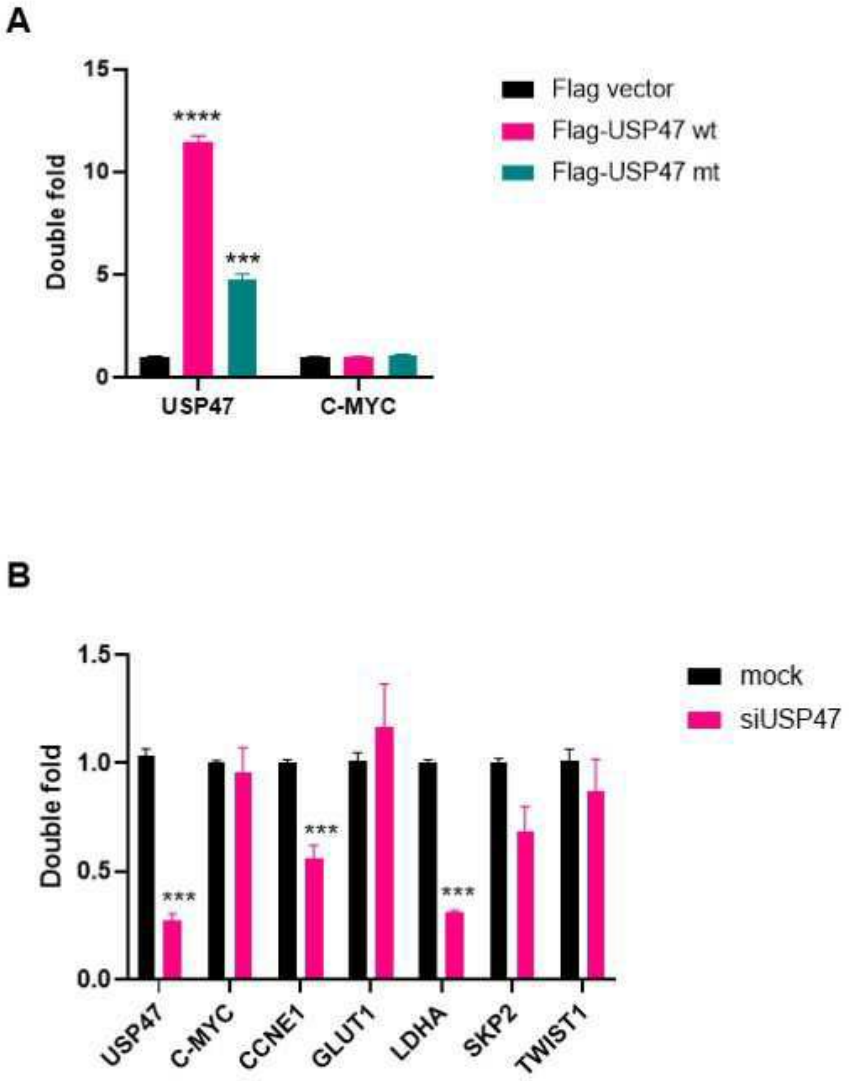
도면6


A
GFP c-Myc
Flag USP47
170
Flag
95
GFP
43
β-actin
A549
GFP c-Myc
Flag USP47
170
Flag
95
GFP
43
β-actin
Calu-1
B
MG132
siUSP47
170
USP47
56
c-Myc
43
β-actin
A549
MG132
siUSP47
170
USP47
56
c-Myc
43
β-actin
Calu-1

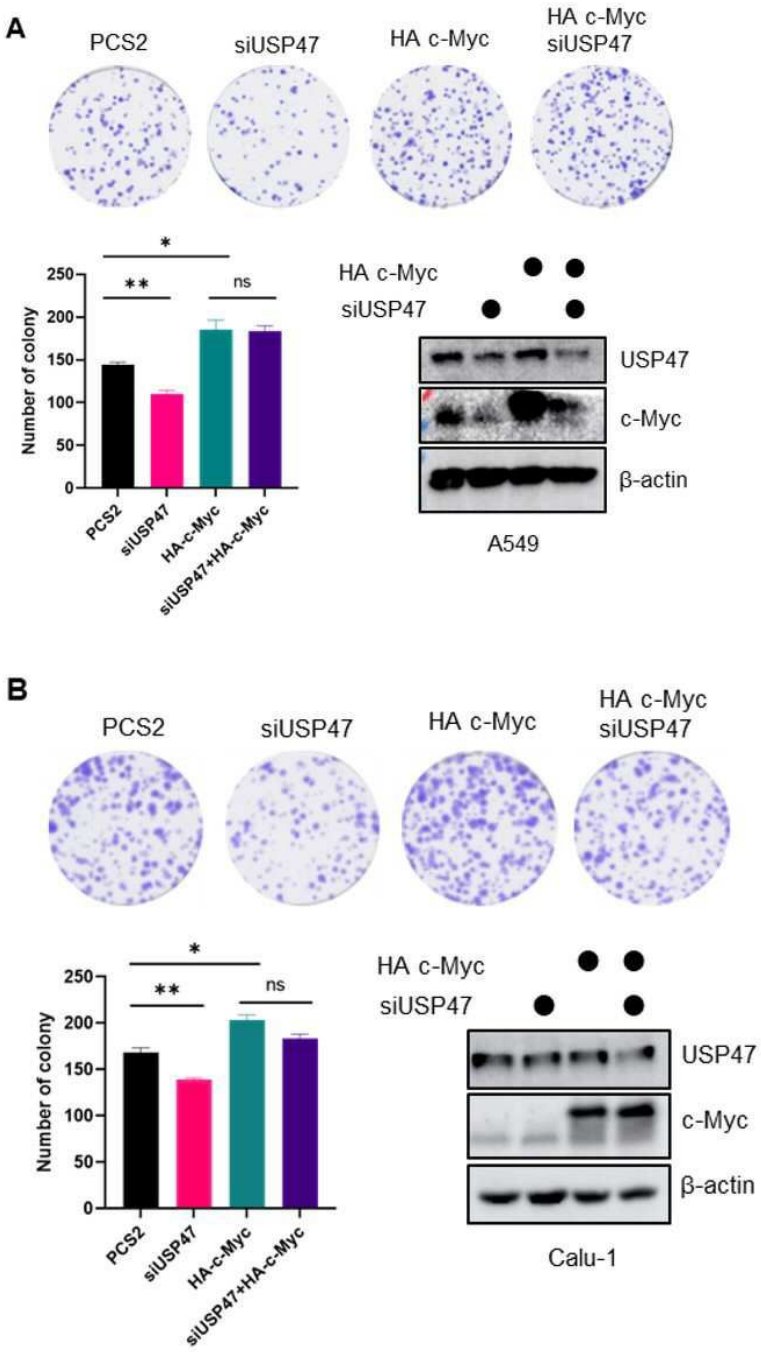
도면7


A
GFP c-Myc
Flag USP47
GFP c-Myc
CHX (min) 0 10 20 30 60 0 10 20 30 60
170
95
43
Flag
GFP
β-actin
B
MOCK
siUSP47
CHX (min) 0 10 20 30 60 0 10 20 30 60
170
56
43
USP47
c-Myc
β-actin

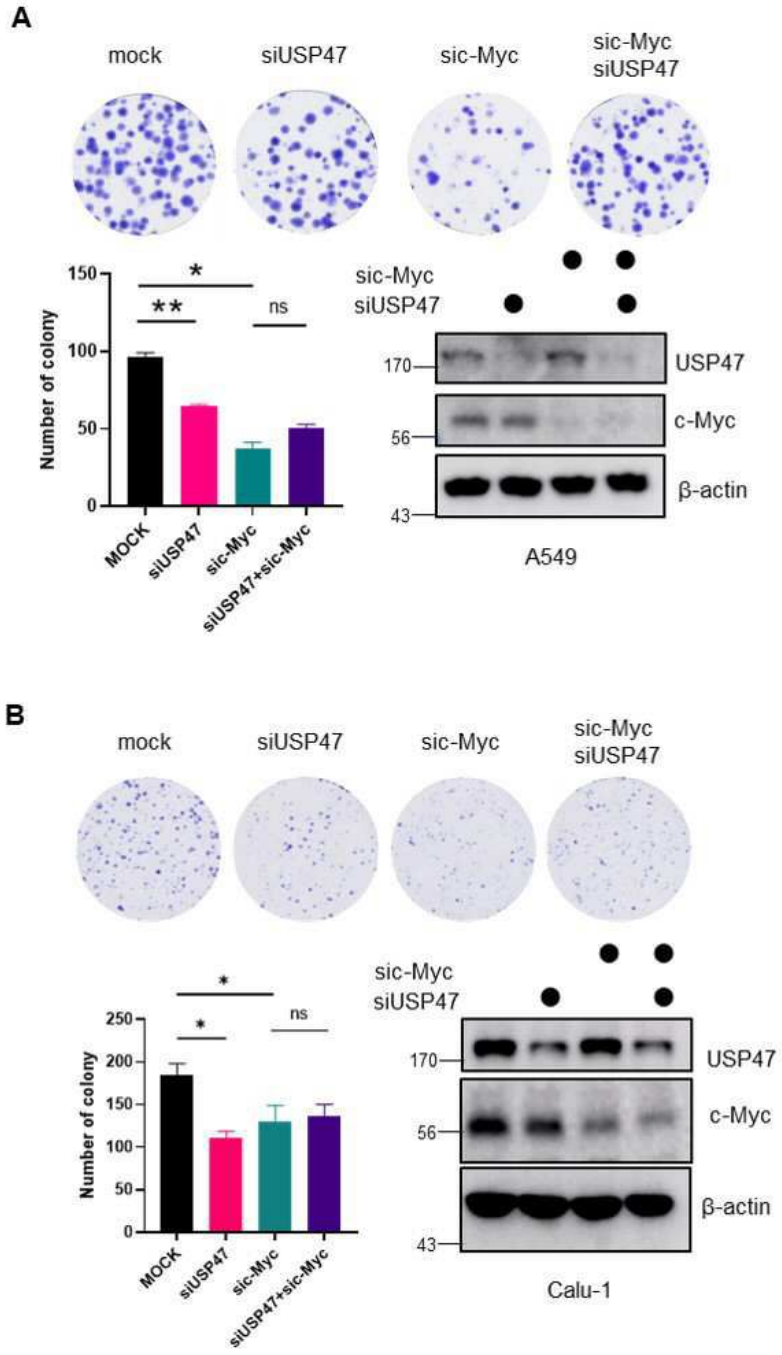
도면8


A
15
10
5
0
Double fold
****
***
USP47
C-MYC
Flag vector
Flag-USP47 wt
Flag-USP47 mt
B
1.5
1.0
0.5
0.0
Double fold
***
***
***
USP47
C-MYC
CCNE1
GLUT1
LDHA
SKP2
TWIST1
mock
siUSP47

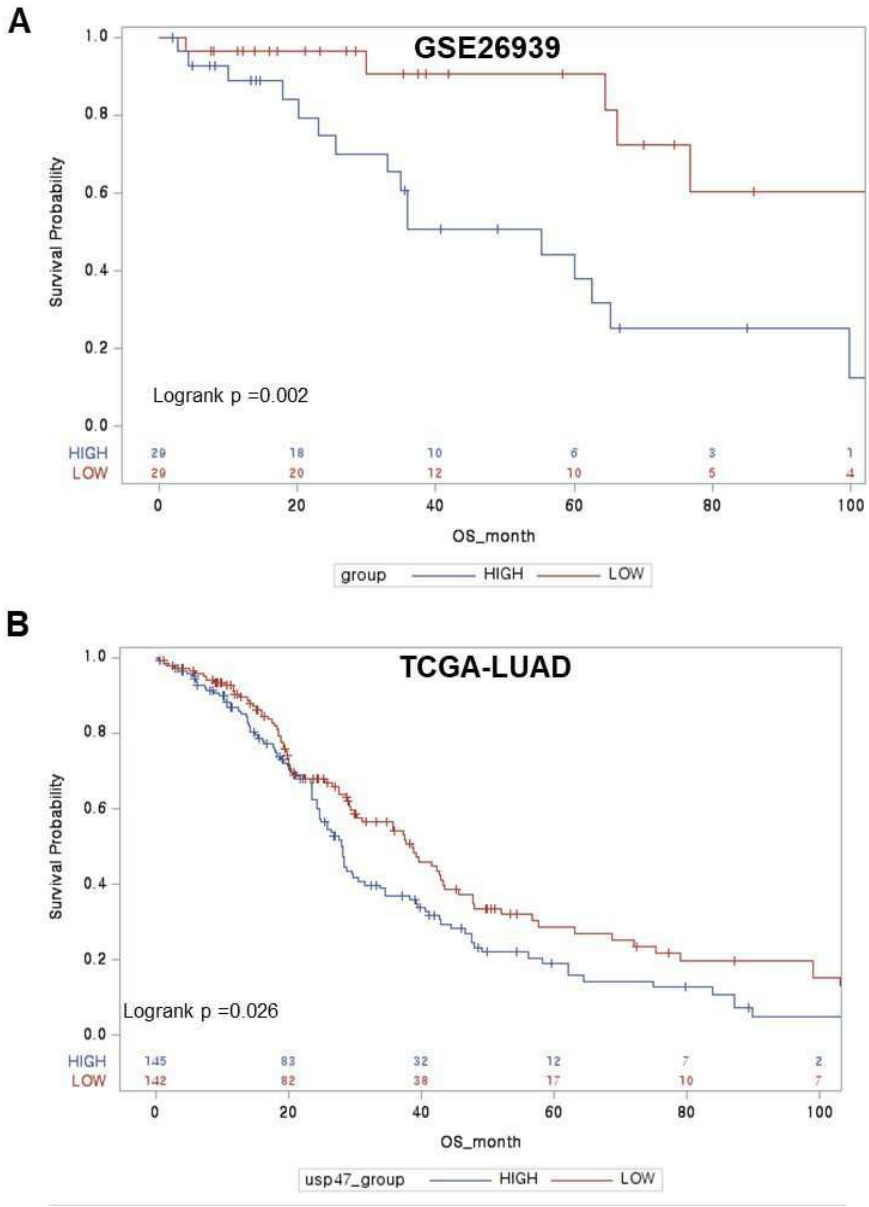
도면9


A
PCS2
siUSP47
HA c-Myc
HA c-Myc
siUSP47
Number of colony
250
200
150
100
50
0
*
**
ns
PCS2
siUSP47
HA-c-Myc
siUSP47+HA-c-Myc
HA c-Myc
siUSP47
USP47
c-Myc
β-actin
A549
B
PCS2
siUSP47
HA c-Myc
HA c-Myc
siUSP47
Number of colony
250
200
150
100
50
0
*
**
ns
PCS2
siUSP47
HA-c-Myc
siUSP47+HA-c-Myc
HA c-Myc
siUSP47
USP47
c-Myc
β-actin
Calu-1

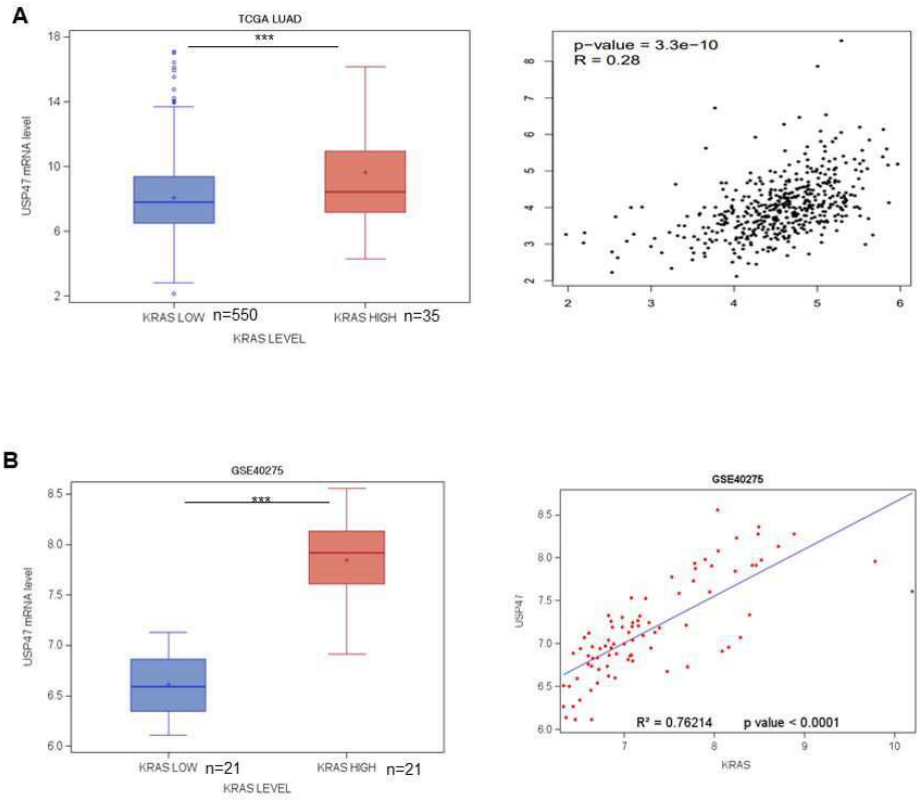
도면10


A
mock
siUSP47
sic-Myc
sic-Myc
siUSP47
Number of colony
150
100
50
0
*
**
ns
MOCK
siUSP47
sic-Myc
siUSP47+sic-Myc
sic-Myc
siUSP47
170
56
43
USP47
c-Myc
β-actin
A549
B
mock
siUSP47
sic-Myc
sic-Myc
siUSP47
Number of colony
250
200
150
100
50
0
*
*
ns
MOCK
siUSP47
sic-Myc
siUSP47+sic-Myc
sic-Myc
siUSP47
170
56
43
USP47
c-Myc
β-actin
Calu-1

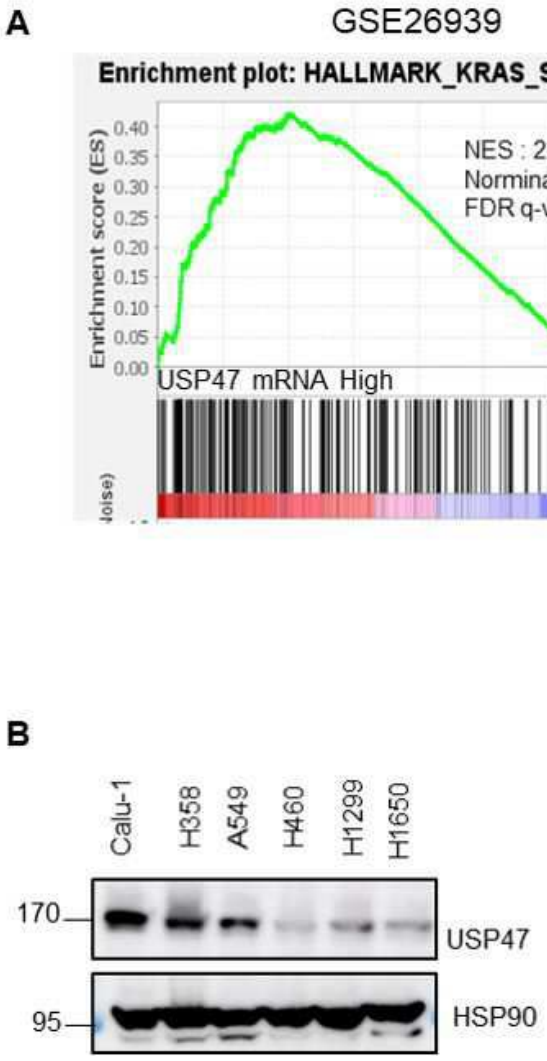
도면11


A
GSE26939
Survival Probability
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Logrank p =0.002
HIGH 29 18 10 6 3 1
LOW 29 20 12 10 5 4
0 20 40 60 80 100
OS_month
group HIGH LOW
B
TCGA-LUAD
Survival Probability
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Logrank p =0.026
HIGH 145 83 32 12 7 2
LOW 142 82 38 17 10 7
0 20 40 60 80 100
OS_month
usp47_group HIGH LOW

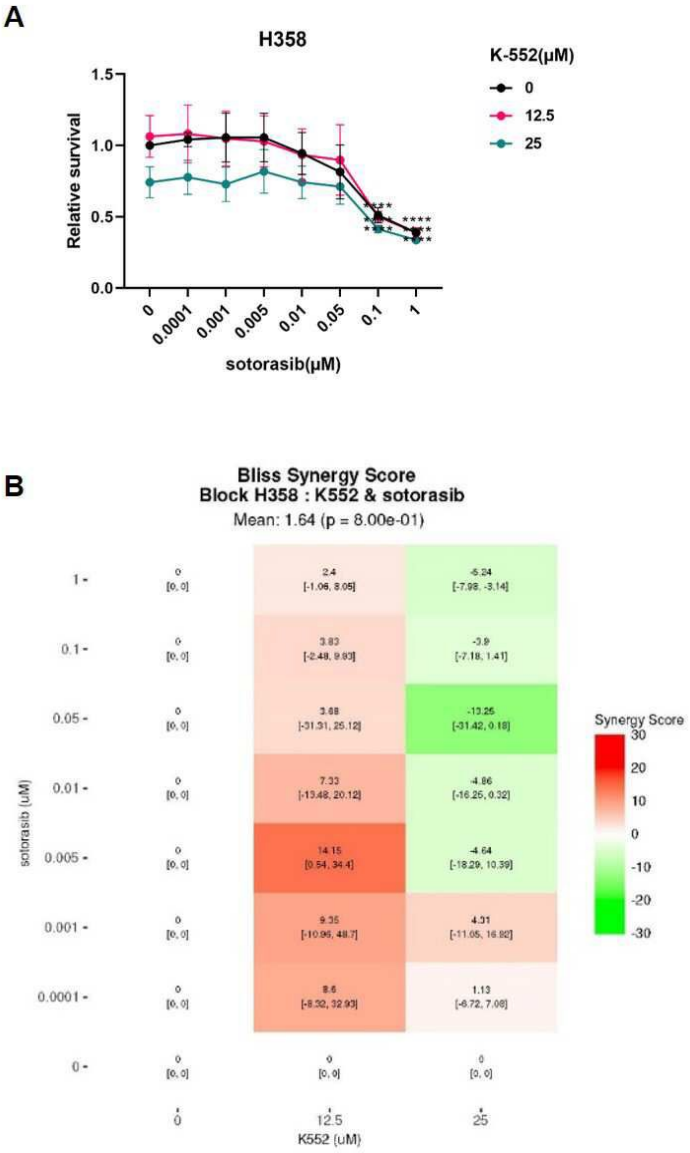
도면12


A
TCGA LUAD
***
USP47 mRNA level
KRAS LOW n=550
KRAS HIGH n=35
KRAS LEVEL
p-value = 3.3e-10
R = 0.28
B
GSE40275
***
USP47 mRNA level
KRAS LOW n=21
KRAS HIGH n=21
KRAS LEVEL
GSE40275
USP47
R² = 0.76214
p value < 0.0001
KRAS

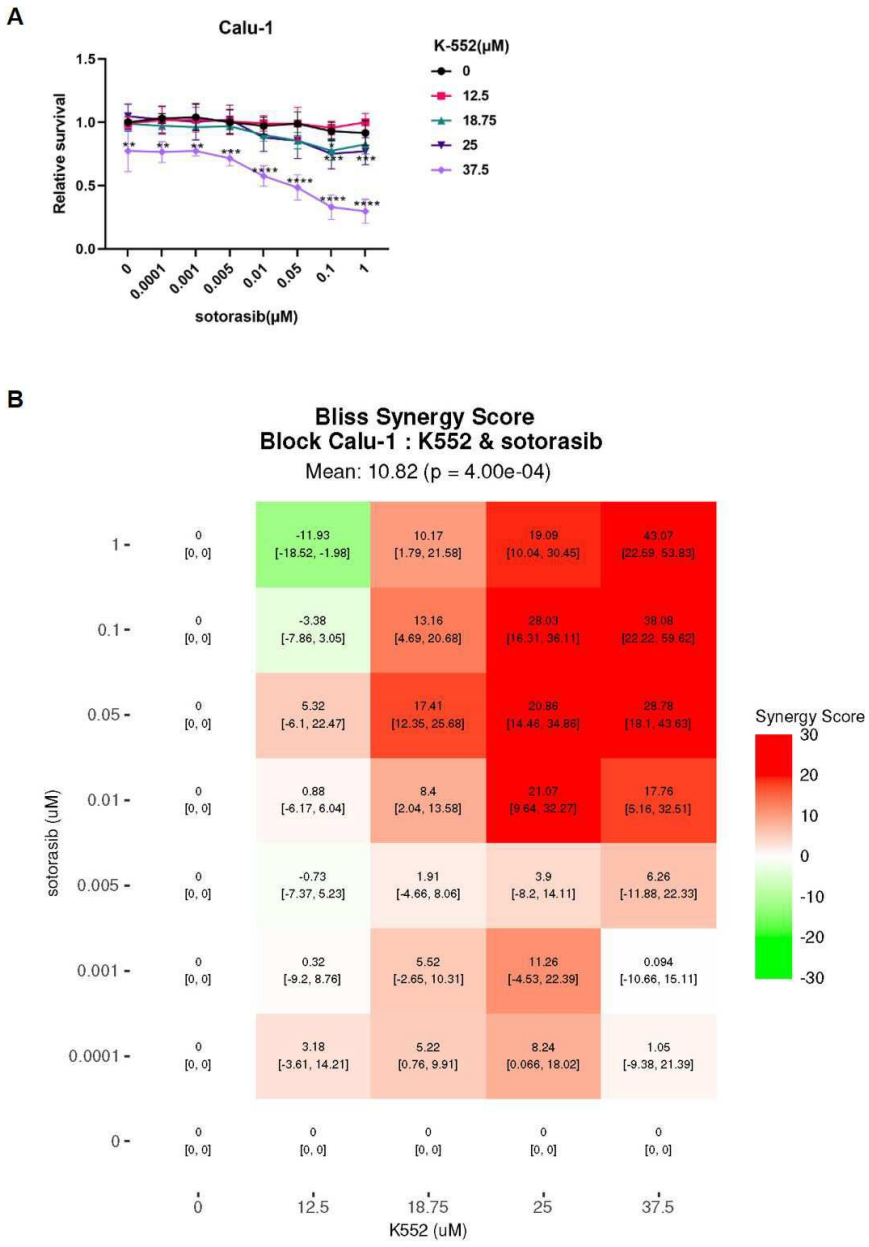
도면13


A
GSE26939
Enrichment plot: HALLMARK_KRAS_SIGNALING_UP
Enrichment score (ES)
0.40
0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
NES : 2.0770576
Norminal p-value : <0.001
FDR q-value : <0.001
USP47 mRNA High
B
Calu-1
H358
A549
H460
H1299
H1650
170
USP47
95
HSP90

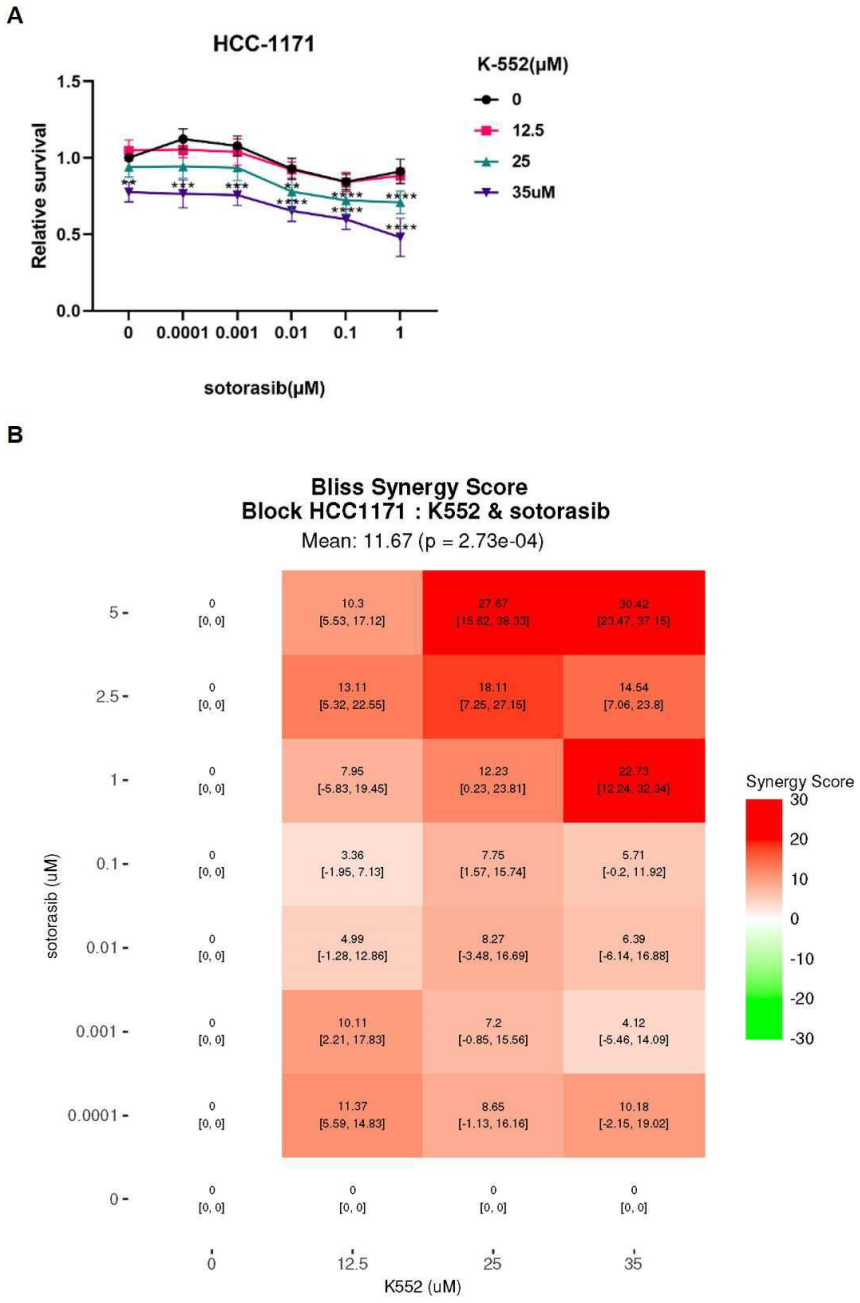
도면14


A
H358
K-552(μM)
0
12.5
25
Relative survival
1.5
1.0
0.5
0.0
0
0.0001
0.001
0.005
0.01
0.05
0.1
1
sotorasib(μM)
B
Bliss Synergy Score
Block H358 : K552 & sotorasib
Mean: 1.64 (p = 8.00e-01)
sotorasib (uM)
1
0.1
0.05
0.01
0.005
0.001
0.0001
0
2.4
[-1.06, 8.05]
-5.24
[-7.98, -3.14]
3.83
[-2.48, 9.93]
-3.9
[-7.18, 1.41]
3.68
[-31.31, 25.12]
-13.25
[-31.42, 0.18]
7.33
[-13.48, 20.12]
-4.86
[-16.25, 0.32]
14.15
[0.54, 34.4]
-4.64
[-18.29, 10.39]
9.35
[-10.96, 48.7]
4.31
[-11.05, 16.82]
8.6
[-8.32, 32.93]
1.13
[-6.72, 7.08]
0
[0, 0]
0
12.5
25
K552 (uM)
Synergy Score
30
20
10
0
-10
-20
-30

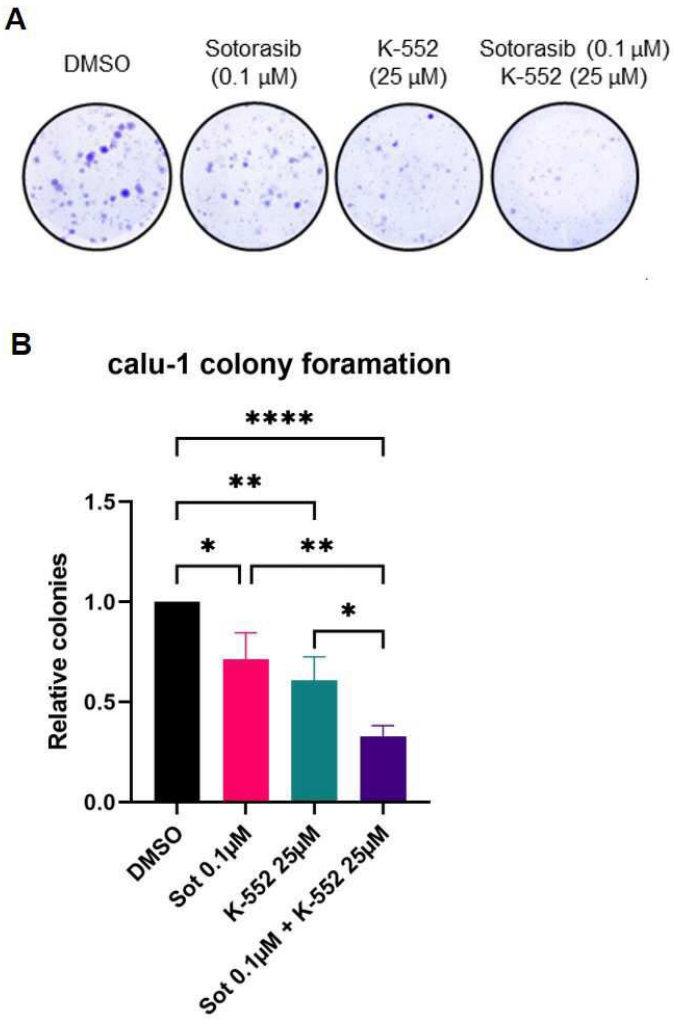
도면15


A
Calu-1
K-552(μM)
0
12.5
18.75
25
37.5
Relative survival
1.5
1.0
0.5
0.0
0
0.0001
0.001
0.005
0.01
0.05
0.1
1
sotorasib(μM)
B
Bliss Synergy Score
Block Calu-1 : K552 & sotorasib
Mean: 10.82 (p = 4.00e-04)
sotorasib (uM)
1
0.1
0.05
0.01
0.005
0.001
0.0001
0
-11.93 [-18.52, -1.98]
10.17 [1.79, 21.58]
19.09 [10.04, 30.45]
43.07 [22.59, 53.83]
-3.38 [-7.86, 3.05]
13.16 [4.69, 20.68]
28.03 [16.31, 36.11]
38.08 [22.22, 59.62]
5.32 [-6.1, 22.47]
17.41 [12.35, 25.68]
20.86 [14.46, 34.86]
28.78 [18.1, 43.63]
0.88 [-6.17, 6.04]
8.4 [2.04, 13.58]
21.07 [9.64, 32.27]
17.76 [5.16, 32.51]
-0.73 [-7.37, 5.23]
1.91 [-4.66, 8.06]
3.9 [-8.2, 14.11]
6.26 [-11.88, 22.33]
0.32 [-9.2, 8.76]
5.52 [-2.65, 10.31]
11.26 [-4.53, 22.39]
0.094 [-10.66, 15.11]
3.18 [-3.61, 14.21]
5.22 [0.76, 9.91]
8.24 [0.066, 18.02]
1.05 [-9.38, 21.39]
0 [0, 0]
Synergy Score
30
20
10
0
-10
-20
-30
0
12.5
18.75
25
37.5
K552 (uM)

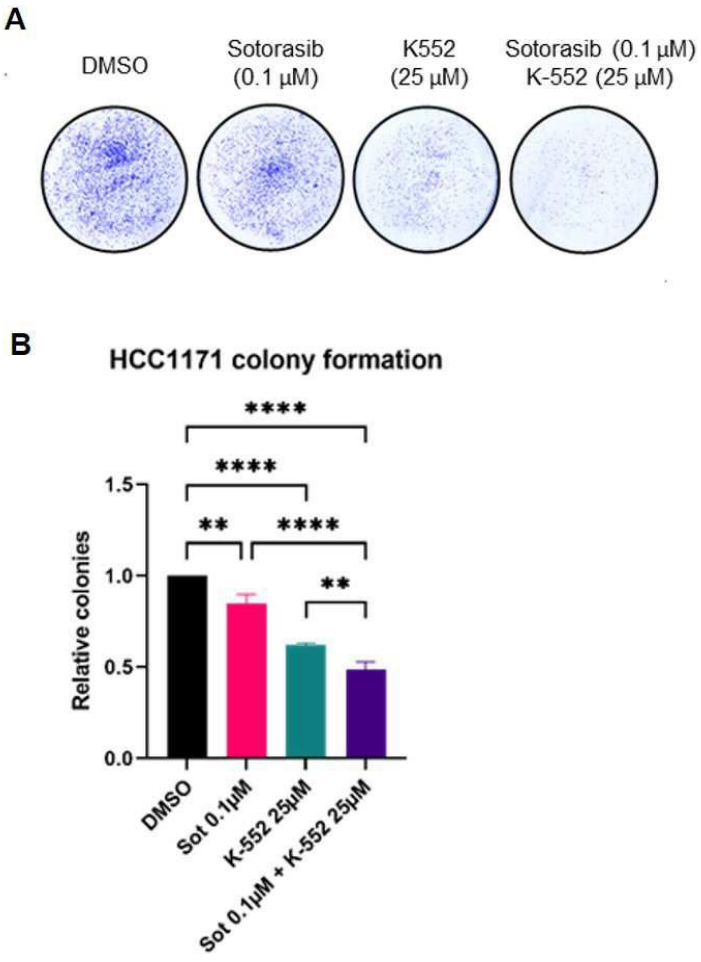
도면16


A
HCC-1171
K-552(μM)
0
12.5
25
35uM
Relative survival
1.5
1.0
0.5
0.0
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
sotorasib(μM)
B
Bliss Synergy Score
Block HCC1171 : K552 & sotorasib
Mean: 11.67 (p = 2.73e-04)
sotorasib (uM)
5
2.5
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
0
10.3 [5.53, 17.12]
27.67 [15.62, 38.33]
30.42 [23.47, 37.15]
13.11 [5.32, 22.55]
18.11 [7.25, 27.15]
14.54 [7.06, 23.8]
7.95 [-5.83, 19.45]
12.23 [0.23, 23.81]
22.73 [12.24, 32.34]
3.36 [-1.95, 7.13]
7.75 [1.57, 15.74]
5.71 [-0.2, 11.92]
4.99 [-1.28, 12.86]
8.27 [-3.48, 16.69]
6.39 [-6.14, 16.88]
10.11 [2.21, 17.83]
7.2 [-0.85, 15.56]
4.12 [-5.46, 14.09]
11.37 [5.59, 14.83]
8.65 [-1.13, 16.16]
10.18 [-2.15, 19.02]
0 [0, 0]
0
12.5
25
35
K552 (uM)
Synergy Score
30
20
10
0
-10
-20
-30

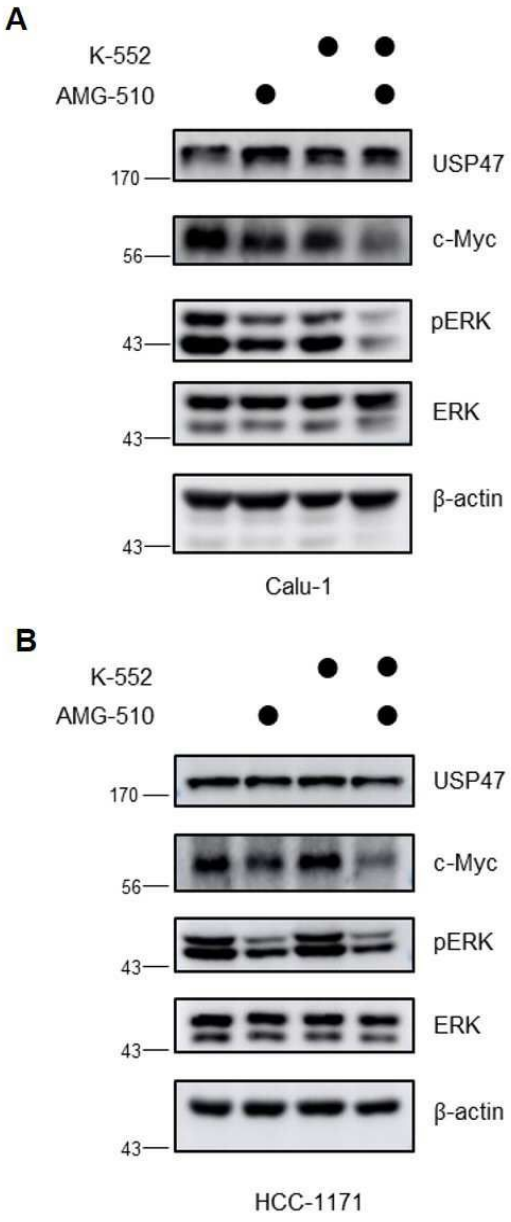
도면17


A
DMSO
Sotorasib (0.1 μM)
K-552 (25 μM)
Sotorasib (0.1 μM) K-552 (25 μM)
B
calu-1 colony foramation
****
**
*
**
*
Relative colonies
1.5
1.0
0.5
0.0
DMSO
Sot 0.1μM
K-552 25μM
Sot 0.1μM + K-552 25μM

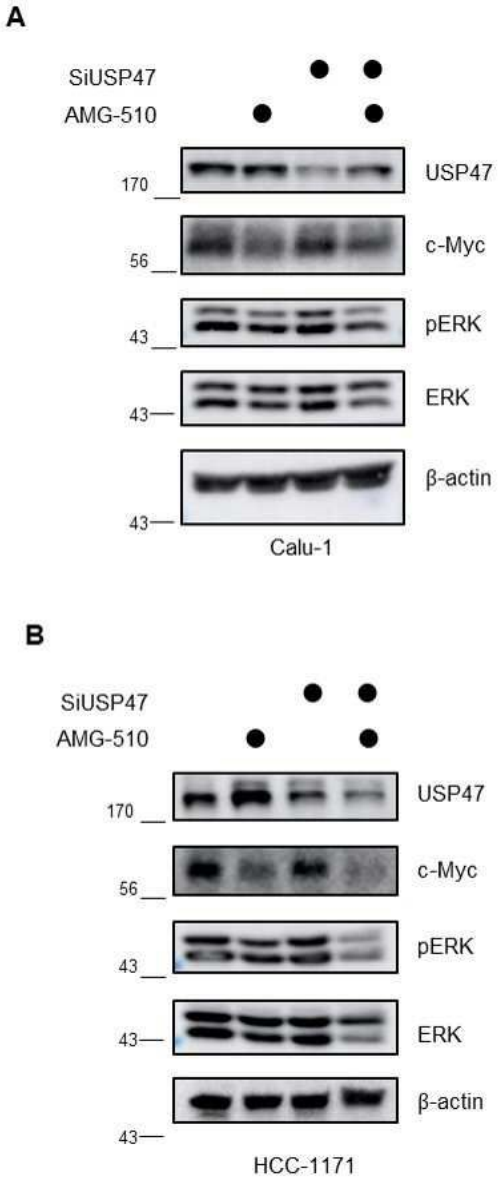
도면18


A
DMSO
Sotorasib (0.1 μM)
K552 (25 μM)
Sotorasib (0.1 μM) K-552 (25 μM)
B
HCC1171 colony formation
****
****
**
****
**
Relative colonies
1.5
1.0
0.5
0.0
DMSO
Sot 0.1μM
K-552 25μM
Sot 0.1μM + K-552 25μM

도면19


A
K-552
AMG-510
170
USP47
56
c-Myc
43
pERK
43
ERK
43
β-actin
Calu-1
B
K-552
AMG-510
170
USP47
56
c-Myc
43
pERK
43
ERK
43
β-actin
HCC-1171

도면20


A
SiUSP47
AMG-510
170
USP47
56
c-Myc
43
pERK
43
ERK
43
β-actin
Calu-1
B
SiUSP47
AMG-510
170
USP47
56
c-Myc
43
pERK
43
ERK
43
β-actin
HCC-1171

*서 열 목 록 (첨부)*



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.