



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0045819
(43) 공개일자 2025년04월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/496 (2024.01) A23L 33/10 (2022.01)
A61K 45/06 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/496 (2024.01)
A23L 33/10 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2023-0129237
(22) 출원일자 2023년09월26일
심사청구일자 2023년09월26일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
이지연
서울특별시 성북구 오패산로13길 19-7 (하월곡동)
김다솜
인천광역시 서구 송학로402번길 13-4, 102동 402호 (검암동, 서원채르빌16차)
민동화
경기도 안산시 단원구 사세충열로2길 19, 102호 (와동)
(74) 대리인
특허법인태백

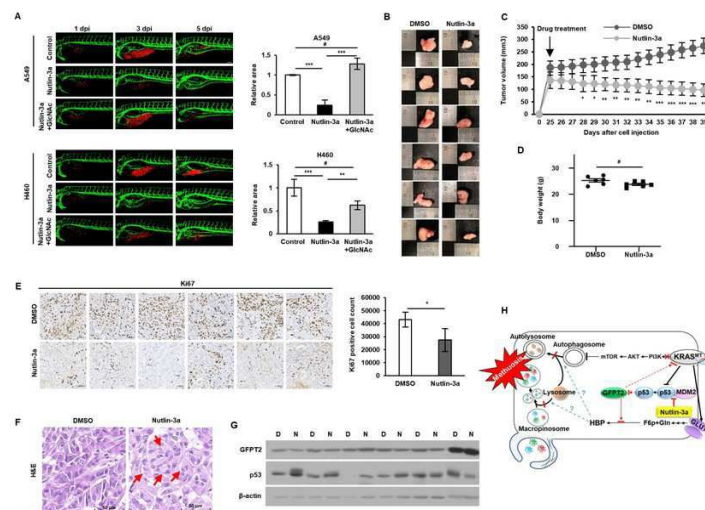
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 Nutlin-3a 또는 이의 유사체를 유효성분으로 포함하는 KRAS 돌연변이를 가진 폐암 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 Nutlin-3a 또는 이의 유사체를 유효성분으로 포함하는 KRAS 돌연변이를 가진 폐암 예방 또는 치료용 조성물에 대한 것으로, MDM2 길항제인 Nutlin-3a가 KRAS-PI3K/Akt-mTOR 경로를 억제하고, 자가포식소체 (autophagosomes) 및 거대음세포(macropinosomes)와 라이소좀의 융합을 모두 방해한다는 것을 확인하였다. 또한, 비-세포사멸적이고 카타스트로피적인(catastrophic) 거대음세포작용(macropinocytosis) 관련 메시오시스 (methuosis) 유사 세포 사멸을 추가로 밝혀냈는데, 특히 KRAS 돌연변이 NSCLC 세포에서 헥소사민(hexosamine) 생합성 경로의 GFPT2에 의존하는 것으로 나타났다. 이에, 상기 결과를 통해, Nutlin-3a가 KRAS 돌연변이 NSCLC를 치료하기 위한 잠재적인 약물로 활용될 수 있다는 것을 확인하였다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

A61K 45/06 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2200/308 (2013.01)

A23V 2250/30 (2013.01)

A61K 2300/00 (2023.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711165482

과제번호 2019R1A2C1083909

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(과기정통부)

연구과제명 MDM2 안타고니스트를 이용한 KRAS 돌연변이 폐암 세포의 ferroptosis 조절 기전 규명

을 통한 치료 방법 연구

기 여 율 50/100

과제수행기관명 고려대학교

연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711187829

과제번호 2023R1A2C1002372

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(과기정통부)

연구과제명 KRAS 돌연변이 폐암 세포 특이적 HBP 대사 경로 조절과 macropinocytosis 기전 규명

을 통한 예후 예측 및 치료 전략 연구

기 여 율 50/100

과제수행기관명 고려대학교

연구기간 2023.03.01 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

Nutlin-3a 또는 이의 유사체를 유효성분으로 포함하는 KRAS 돌연변이를 가진 폐암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 약학 조성물은 KRAS 활성화 및 KRAS-PI3K/Akt 경로의 활성화 수준을 감소시키는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 약학 조성물은 자가포식(autophagy)을 유도하고, 자가포식소체(autophagosome) 및 라이소좀(lysosome)의 융합을 방해하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 약학 조성물은 거대음세포작용(macropinocytosis)에 의한 거대 공포(vacuoles)를 형성하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 약학 조성물은 메시오시스(methuosis) 또는 메시오시스(methuosis)-유사 세포사멸을 유도하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 약학 조성물은 GFPT2 발현 억제를 통해 헥소사민 생합성 경로(hexosamine biosynthetic pathway; HBP)를 하향 조절하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 7

Nutlin-3a 또는 이의 유사체; 및 면역항암제를 유효성분으로 포함하는 KRAS 돌연변이를 가진 폐암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 Nutlin-3a 또는 이의 유사체는 면역항암제와 병용하여 투여되는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 9

제7항 또는 제8항에 있어서, 상기 면역항암제는 항-프로그래밍된 세포사멸 단백질 1(programmed cell death protein 1, PD-1), 항-프로그래밍된 세포사멸 리간드(programmed cell death-ligand, PD-L) 상호작용 억제제, CTLA4(Cytotoxic T Lymphocyte associated Antigen 4, CD152)/B7-1/B7-2 상호작용 억제제 및 CD47(Cluster of Differentiation 47)/SIRP(Signal-regulatory protein) 상호작용 억제제로 이루어진 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 10

Nutlin-3a 또는 이의 유사체를 유효성분으로 포함하는 KRAS 돌연변이를 가진 폐암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 11

Nutlin-3a 또는 이의 유사체; 및 면역항암제를 유효성분으로 포함하는 KRAS 돌연변이를 가진 폐암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 Nutlin-3a 또는 이의 유사체는 면역항암제와 병용하여 투여되는 것을 특징으로 하는 건강기능식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 Nutlin-3a 또는 이의 유사체를 유효성분으로 포함하는 KRAS 돌연변이를 가진 폐암 예방 또는 치료용 조성물에 대한 것이다. 보다 상세하게는 Nutlin-3a를 유효성분으로 포함하는 예방 또는 치료용 조성물이 KRAS 돌연변이를 지닌 비소세포 폐암 특이적으로 KRAS 활성화 및 하위 신호경로인 PI3K/Akt 및 mTOR 신호전달계의 활성을 억제할 뿐만 아니라, GFPT2를 표적으로 하여 헥소아민생합성과정 (Hexosamine Biosynthetic Pathway: HBP)을 조절하여 정상적인 자가포식 활성화 경로 (autophagy flux)와 거대음세포작용 (macropinocytosis)을 저해하여 메시오시스 (methuosis) 또는 메시오시스 유사 세포사멸을 유도함을 규명하였다.

배경 기술

[0002] 폐암 발병률과 사망률은 매년 증가하고 있다. 폐암은 초기 발견이 어렵기 때문에 다른 암과 마찬가지로 진행된 병기에 진단되는 경우가 많아 예후가 좋지 않다. 비소세포폐암(Non-small cell lung cancer; NSCLC)은 폐암의 가장 흔한(~85%) 조직학적 서브타입으로, KRAS (25%), EGFR (23%), PIK3CA (3%), BRAF (3%), MET (2%) 및 ERBB2 (1%)과 같은 발암성 돌연변이를 갖는데, 이러한 돌연변이는 암 진행을 촉진하는 데 중요한 역할을 한다. 상기 드라이버 돌연변이들은 약물 개발을 위한 분자 표적으로 사용되어 왔다. 그중 KRAS 돌연변이는 가장 흔한 돌연변이로서, 아미노산 잔기 G12, G13, L19, D33 또는 Q61에 돌연변이를 갖는다. KRAS를 직접 및 간접적으로 표적하는 약물을 개발하기 위한 여러 노력에도 불구하고, 소토라십(sotorasib; Lumakras)이 미국 FDA로부터 혁신 신약(first-in-class) KRAS-G12C 억제제로 승인된 2021년까지는 약물 개발이 진행되지 않았다. 하지만, 소토라십은 G12C를 제외한 다른 형태의 KRAS 돌연변이들에 대해서는 여전히 효과가 없고, 결국 내성이 발생하기 때문에 다른 치료 전략이 필요하다.

[0003] 최근, 종양 대사의 리프로그래밍이 암세포의 특징 중 하나이기 때문에, 대체 치료법으로 암에서 세포 대사의 역할에 대해 특별히 연구되고 있다. NSCLC 세포를 포함하는 KRAS 돌연변이 암세포는 암세포 성장, 증식 및 생존을 위한 뚜렷한 대사 리프로그래밍을 나타내고, 거대음세포작용(macropinocytosis) 및 자가포식(autophagy)과 같은 영양 제거 과정을 자극할 수 있는데, 이는 내재성 소포, 거대음세포(macropinosomes) 및 자가포식소체(autophagosome)를 생성한다. 상기 소포들은 결국 라이소좀과 합쳐져 영양분을 분해하고, 동화작용 경로를 통한 거대분자 합성 용도로서 암세포에 대한 뉴클레오타이드, 유리 아미노산, 지질 및 글루코스의 풀을 제공한다. 신경모세포종, 교모세포종 및 대장암에서의 활성화 발암성 RAS는 새로운 형태의 카스파제 독립적 세포 사멸인 메시오시스(methuosis)와 연관되어 있으며, 이는 거대음세포의 비정상적인 성장에서 유래된 거대한 세포질 공포(vacuoles)가 존재하는 특징을 갖는다. 세포골격 요소와 동적으로 결합하고, 리사이클링을 위해 표지되거나 라이소좀과 융합되는 정상적인 거대음세포에 비해, 메시오시스에 나타난 기능장애 거대음세포는 서로 융합하여 거대한 공포를 형성하고, 부종으로 인해 세포가 파열된다. 하지만, 이 현상의 기초가 되는 정확한 메커니즘은 현재 명확히 알려져 있지 않은 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2022-0097306호 (2022.07.07 공개)
(특허문헌 0002) 국제공개특허 WO 2023/031781 A1 (2023.03.09 공개)

비특허문헌

[0005] (비특허문헌 0001) Oncotarget. 2015; 6(26): 22666-79 (2015.06.10 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 이에, 본 발명에서는 Nutlin-3a 또는 이의 유사체를 유효성분으로 포함하는 KRAS 돌연변이를 가진 폐암 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하는 데에 그 목적이 있다.

[0007] 또한, 본 발명에서는 Nutlin-3a 또는 이의 유사체; 및 면역항암제를 유효성분으로 포함하는 KRAS 돌연변이를 가진 폐암 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하는 데에 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 Nutlin-3a 또는 이의 유사체를 유효성분으로 포함하는 KRAS 돌연변이를 가진 폐암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 Nutlin-3a 또는 이의 유사체; 및 면역항암제를 유효성분으로 포함하는 KRAS 돌연변이를 가진 폐암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 Nutlin-3a 또는 이의 유사체를 유효성분으로 포함하는 KRAS 돌연변이를 가진 폐암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 Nutlin-3a 또는 이의 유사체; 및 면역항암제를 유효성분으로 포함하는 KRAS 돌연변이를 가진 폐암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명은 Nutlin-3a 또는 이의 유사체를 유효성분으로 포함하는 KRAS 돌연변이를 가진 폐암 예방 또는 치료용 조성물에 대한 것으로, MDM2 길항제인 Nutlin-3a가 KRAS-PI3K/Akt-mTOR 경로를 억제하고, 자가포식소체 (autophagosomes) 및 거대음세포(macropinosomes)과 라이소좀의 융합을 모두 방해한다는 것을 확인하였다. 또한, 비-세포사멸적이고 카타스트로피적인(catastrophic) 거대음세포작용(macropinocytosis) 관련 메시오시스 (methuosis) 유사 세포 사멸을 추가로 밝혀냈는데, 특히 KRAS 돌연변이 NSCLC 세포에서 헥소사민(hexosamine) 생합성 경로의 GFPT2에 의존하는 것으로 나타났다. 이에, 상기 결과를 통해, Nutlin-3a가 KRAS 돌연변이 NSCLC 를 치료하기 위한 잠재적인 약물로 활용 및 면역치료제와 병용될 수 있다는 것을 확인하였다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 Nutlin-3a가 KRAS 활성화의 억제 및 KRAS-PI3K/Akt 경로를 통해 KRAS 돌연변이 NSCLC 세포의 생존력을 감소시킨다는 결과를 나타낸다.

도 2는 Nutlin-3a가 KRAS 돌연변이 NSCLC 세포에서 자가포식소체와 라이소좀의 융합을 방해한다는 결과를 나타낸다.

도 3은 Nutlin-3a가 KRAS 돌연변이 NSCLC 세포에서 거대 세포질 공포를 유도한다는 결과를 나타낸다.

도 4는 Nutlin-3a가 KRAS 돌연변이 NSCLC 세포의 메시오시스 유사 사멸을 유도한다는 결과를 나타낸다.

도 5는 Nutlin-3a에 의한 GFPT2 발현의 하향 조절은 KRAS 돌연변이 NSCLC 세포에서 HBP 대사체의 양을 변화시킨다는 결과를 나타낸다.

도 6은 Nutlin-3a에 의해 유발된 메시오시스 유사 세포 사멸은 KRAS 돌연변이 NSCLC 세포에서 HBP와 관련이 있다는 결과를 나타낸다.

도 7은 GFPT2가 Nutlin-3a 유도 세포 사멸의 표적이라는 결과를 나타낸다.

도 8은 생체 내에서 확인된 Nutlin-3a의 항암 효과를 나타낸다.

도 9는 Nutlin-3a가 KRAS 돌연변이 NSCLC 세포에서 PD-L1 발현의 하향 조절을 유도한다는 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0014] 본 발명은 Nutlin-3a 또는 이의 유사체를 유효성분으로 포함하는 KRAS 돌연변이를 가진 폐암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0015] 바람직하게는, 상기 약학 조성물은 KRAS의 활성화 및 KRAS-PI3K/Akt 경로의 활성화 수준을 감소시킬 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0016] 바람직하게는, 상기 약학 조성물은 자가포식(autophagy)을 유도하고, 자가포식소체(autophagosome) 및 라이소좀(lysosome)의 융합을 방해할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0017] 바람직하게는, 상기 약학 조성물은 거대음세포작용(macropinocytosis)에 의한 거대 공포(vacuoles)를 형성할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0018] 바람직하게는, 상기 약학 조성물은 메시오시스(methuosis) 또는 메시오시스(methuosis)-유사 세포사멸을 유도할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0019] 바람직하게는, 상기 약학 조성물은 GFPT2 발현 억제를 통해 헥소사민 생합성 경로(hexosamine biosynthetic pathway; HBP)을 하향 조절할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0020] 또한, 본 발명은 Nutlin-3a 또는 이의 유사체; 및 면역항암제를 유효성분으로 포함하는 KRAS 돌연변이를 가진 폐암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0021] 바람직하게는, 상기 Nutlin-3a 또는 이의 유사체는 면역항암제와 병용하여 투여될 수 있다.
- [0022] 바람직하게는, 상기 면역항암제는 항-프로그래밍된 세포 사멸 단백질 1(programmed cell death protein 1, PD-1), 항-프로그래밍된 세포 사멸 리간드(programmed cell death-ligand, PD-L) 상호작용 억제제, CTLA4(Cytotoxic T Lymphocyte associated Antigen 4, CD152)/B7-1/B7-2 상호작용 억제제 및 CD47(Cluster of Differentiation 47)/SIRP(Signal-regulatory protein) 상호작용 억제제로 이루어진 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0023] 본 발명의 약학 조성물은 유효 성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등의 가용화제를 사용할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 투여를 위해서 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1 종 이상 포함하여 약학 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 약학 조성물의 약제 제제 형태는 과립제, 산제, 피복정, 정제, 캡슐제, 좌제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 및 활성 화합물의 서방출형 제제 등이 될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 유효성분의 유효량은 질환의 예방 또는 치료 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다.
- [0025] 또한, 본 발명은 Nutlin-3a 또는 이의 유사체를 유효성분으로 포함하는 KRAS 돌연변이를 가진 폐암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0026] 또한, 본 발명은 Nutlin-3a 또는 이의 유사체; 및 면역항암제를 유효성분으로 포함하는 KRAS 돌연변이를 가진 폐암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0027] 바람직하게는, 상기 Nutlin-3a 또는 이의 유사체는 면역항암제와 병용하여 투여될 수 있다.
- [0028] 본 발명의 건강기능식품 조성물은 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽 또는 음료의 형태로 제공될 수 있으며, 상기 건강기능식품 조성물은 유효성분 이외에 다른 식품 또는 식품 첨가물과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라

적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적 예를 들어 예방, 건강 또는 치료적 처치에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0029] 상기 건강기능식품 조성물에 함유된 유효성분의 유효용량은 상기 약학조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있음은 확실하다.

[0030] 상기 건강식품의 종류에는 특별한 제한이 없고, 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등을 들 수 있다.

[0031] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0032] <실험예>

[0033] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

[0034] 1. 세포 배양 및 시약

[0035] 인간 정상 기관지 상피세포주인 BEAS-2B와 9개의 인간 비소세포폐암 세포주 HCC827, H1299, H1975, PC9, PC9GR, H820, A427, A549와 H460은 각각 American Type Culture Collection (ATCC) 및 한국세포주은행 (KCLB) 으로부터 구매하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium (Hyclone, Logan, UT, USA) 에서 배양한 A427를 제외하고 나머지 세포들은 10% FBS (fetal bovine serum, Welgene)과 1% 페니실린/스트렙토마이신 (penicillin/streptomycin)이 첨가된 RPMI 배지 (Welgene) 에서 5% CO₂ 배양기로 37℃에서 세포를 유지하며 배양하였다. Nutlin-3a, bafilomycin A1, LY294002, DMSO는 Sigma Aldrich로부터 구입하였다. Etoposide, Z-VAD-FAK, EHT1864는 Selleckchem으로부터 구입하였다. EIPA는 Cayman Chemical company로부터 구입하였다. GFPT2 유전자 knockdown에 사용된 Endoribonuclease-prepared small interfering RNAs (esiRNAs)는 Sigma Aldrich로부터 구입하였다.

[0036] 2. 세포 증식 및 생존률 분석

[0037] 세포 증식은 세포 (3-5×10⁵) 를 6-웰 플레이트에 접종하고 세포 계수 방법을 이용하여 측정하였다. 배양 24시간 후, 세포를 트립신 처리하고 hemacytometer로 계수하였다. 대표적인 이미지는 도립 광학 현미경 (Olympus IX71, Olympus Corp) 을 이용하여 촬영하였다. 세포 생존률은 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) 분석을 이용하여 수행하였다. 세포 (1×10³) 를 96웰 세포배양 플레이트에 접종하여 24시간 배양한 후 nutlin-3a를 처리하거나 처리하지 않았다. 세포배양 48시간 후에 50uL의 MTT 용액 (0.5mg/ml) (Sigma-aldrich) 를 첨가하고, 4시간 추가 배양한 후에 MTT 용액을 제거하고 dimethyl Sulfoxide (DMSO)를 추가하였다. 마이크로 플레이트 리더 (SpectraMax Plus 384)를 이용하여 570nm의 흡광도를 측정하였다.

[0038] 3. 콜로니 생성 분석

[0039] 세포 (500) 를 6-웰 플레이트에 접종하였다. 14일 후 육안으로 군체가 보이면 고정액으로 고정한 뒤 Hemacolor® rapid staining solutions (Merck & Co., Inc., Rahway, NJ, USA)을 이용하여 5분씩 염색하였다. 이미지는 스캐너 (SCX8123, Samsung, Suwon, South Korea) 를 통해 얻었으며, 콜로니의 개수는 ImageJ (version 1/52n, NIH, Bethesda, MD, USA) 를 이용하여 측정하였다.

[0040] 4. 유세포 분석

[0041] 세포 (5×10⁵) 를 6-cm 디쉬에 접종한 후 24시간 동안 배양하였다. 세포 주기 분석을 위해 nutlin-3a 처리된 세포를 얼음처럼 차가운 70% 에탄올로 고정하고 -20℃에서 최소 1시간 동안 배양한 후 PBS로 세척한 다음 0.1 mg/mL의 PBS 내 2mM EDTA 완충액에 재현탁하였다. RNase A 및 50 mg/mL PI (P4864, Sigma-Aldrich)로 어두운 곳에서 -20℃에서 20분 동안 염색하여 1시간 이내로 유세포 분석 (BD FACS Canto™ II, Becton, Dickinson and Company, USA) 을 진행하였다. 세포 사멸을 조사하기 위해, 세포를 24시간 동안 nutlin-3a와 함께 GlcNAc 및 GlcN를 첨가 또는 비첨가하거나, siGFPT2로 형질 감염시켰다. 샘플은 FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit

I (BD Pharmingen™, NJ, USA) 를 사용하여 염색한 뒤 유세포 분석을 진행하여 세포사를 측정하였다.

[0042] **5. RNA 분리 및 역전사-정량 중합효소 연쇄 반응 (RT-qPCR)**

[0043] 제조사의 지침에 따라 TRIzol 시약 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 을 사용하여 세포로부터 RNA를 분리하고 cDNA 합성 키트 (Cosmo Genetech, Seoul, South Korea) 를 사용하여 cDNA로 역전사시켰다. RT-qPCR은 ABI 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Warrington, UK) 기기를 이용하여 SYBR Green Q Master (Cosmo Genetech) 시약과 유전자 특이적 프라이머를 사용하여 수행하였다. 사용된 프라이머는 다음과 같다: GFPT2 정방향: 5'- AGGTGCATTCGCGCTGGTT -3', 역방향: 5'- TGTGGAGAGCTTGATTTGCTCC -3'; CD274 (PD-L1) 정방향: 5'- TGGCATTGTGTAACGCATTT -3', 역방향: 5'- TGCAGCCAGGTCTAATTGTTTT -3', GAPDH 정방향: 5'- ACCCACTCCTCCACCTTTGA -3', 역방향: 5'- CTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT -3'. 표적 유전자의 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 값은 내인성 대조군인 GAPDH의 값으로 정규화하였다.

[0044] **6. 웨스턴 블롯 분석**

[0045] 세포 용해물의 단백질을 SDS-PAGE를 통해 분리하고 Immobilon-P PVDF 멤브레인 (IPVH00010, Merck & Co., Inc., USA) 으로 전기이동 (transfer) 시켰다. 이 멤브레인은 이후에 표시된 1차 항체로 탐침하였고 horseradish peroxidase (HRP)가 결합된 goat anti-rabbit IgG 혹은 goat anti-mouse IgG (Cell Signaling Technology, USA) 2차 항체와 함께 반응시켰다. 향상된 화학발광 (ECL) 시스템 (Translab, Daejeon, South Korea) 을 제조업체의 지침에 따라 처리하여 신호를 검출하였다. p53 (sc-126), B-Raf (sc-5284), c-Myc (sc-40), O-GlcNAc (sc-59623) 및 β -actin (sc-47778) 에 대한 1차 항체는 Santa Cruz Biotechnology (CA, USA) 에서 구입하였다. KRAS (12063-1-AP)에 대한 항체는 Proteintech (Rosemont, IL, USA) 에서 구입하였다. PI3 kinase p110 α (#4249), Akt (#4691), p-Akt (#4060), p-B-Raf (#2696), C-Raf (#9422), p-C-Raf (#9427), MEK 1/2 (#9122), p-MEK 1/2 (#9154), Erk1/2 (#9102), p-Erk1/2 (#9101), caspase-9 (#9502), caspase-3 (#9662), PARP (#9542), mTOR (#2983), p-mTOR (#5536), p-p70S6K1 (#9234) 및 p-4EBP1 (#2855), PD-L1 (#13684)은 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) 에서 구입하였다. p62 (ab56416) 및 GFPT2 (ab190966)에 대한 항체는 Abcam (Cambridge, UK)에서 구입하였다. Rac1 (610650)에 대한 항체는 Becton, Dickinson and Company에서 구입하였다. LC3 (PB036)에 대한 항체는 MBL (Nagoya, Japan)에서 구입하였다.

[0046] **7. N-글리코실화 분석**

[0047] N-글리코실화는 멤브레인을 콘카나발린 A-HRP 렉틴 (L6397; Sigma; 0.25 μ g/ml in high-salt TBST [1 M NaCl in TBST]) 용액에 넣어 밤새도록 4°C에서 반응시켰다. 그 후 high-salt TBST에서 10분씩 1시간 동안 세척한 후 화학발광 (ECL system) 을 사용하여 가시화하였다.

[0048] **8. KRAS 활성화 실험**

[0049] KRAS의 활성화는 제조사의 프로토콜에 따라 KRAS Activation Assay 키트 (STA-400-K, Cell Biolabs, USA) 를 사용하여 측정하였다. 간략하게, 세포를 회수하고 얼음처럼 차가운 PBS로 세척한 후, 1 $\times$ 프로테아제 억제제 콕테일을 포함하는 얼음처럼 차가운 PBS 1 $\times$ assay/lysis 완충액으로 용해시켰다. 용해물을 14,000g에서 10분 동안 4°C에서 원심분리하였다. 상층액 (500 μ g) 을 Raf1 RBD 아가로스 비드와 함께 인큐베이션하여 KRAS-GTP를 검출하였다. 비드를 1 $\times$ assay 완충액으로 3회 세척하였다. 결합된 단백질을 2 $\times$ Laemmli 샘플 완충액으로 용출시키고 SDS-PAGE 겔에 로딩하였다. 1차 KRAS 항체는 키트와 함께 제공된 것을 사용하였다.

[0050] **9. 면역형광 염색**

[0051] 세포 (1×10^5) 를 12-웰 플레이트에 놓인 커버슬립에 접종하였다. 24시간 후, 세포를 얼음처럼 차가운 PBS로 2회 세척하고 실온에서 15분 동안 4% 포름알데히드로 고정하였다. 고정된 세포를 얼음처럼 차가운 PBS로 5분 동안 3회 세척한 후, 세포를 0.1% TritonX-100이 함유된 PBS로 15분 동안 투과시키고, 3% BSA로 차단한 후, Rac1, LAMP1 (sc-20011, Santa Cruz Biotechnology), Rab7 (#9367, Cell Signaling Technology) 항체를 암실에서 4°C에서 하룻밤 동안 반응시킨 다음 Alexa Fluor 488 또는 546이 결합된 이차 항체와 함께 반응시켰다. Rhodamine-phalloidin (R415; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 을 사용하여 어두운 곳에서 1 시간 동안 F-액틴을 염색하였다. 각 커버슬립은 핵 염색을 위한 DAPI (Vectashield; H1200, Vector Laboratories, USA) 를 포함하는 배지에서 반응시켰다. 형광 이미지는 공초점 레이저 스캐닝 현미경 (LSM 780 및 LSM800, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) 에서 적절한 대물 렌즈를 사용하여 관찰하였다.

[0052] 10. 덱스트란 (Dextran) 흡수 분석

[0053] 세포 (2×10^5) 를 공초점 디쉬에 접종하고 24시간 배양하였다. 덱스트란 (D22910, Sigma) 및 lysotracker (L7528, Thermo Fisher Scientific) 를 각각 제조사의 프로토콜에 따라 세포에 반응시켰다. 형광 이미지는 공초점 레이저 스캐닝 현미경 (LSM 780 및 LSM800, Carl Zeiss) 의 100x oil 또는 40x water immersion 대물 렌즈를 이용하여 관찰하고 획득하였다.

[0054] 11. 라이브 홀로토포그래피 현미경

[0055] 세포 (2×10^5) 를 TomoDish (Tomocube Inc., Daejeon, South Korea) 에 접종하고 24시간 배양하였다. 3D label-free 세포 이미지는 3D 홀로토포그래피 현미경 (HT-2H, Tomocube Inc.) 을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 농도 하에 파장 532nm에서 획득하였다. 세포는 무표지 (label-free) 이미징을 허용하는 반사 지수 측정 (reflective index measurement) 을 기반으로 시각화하였다.

[0056] 12. 자가포식과정 (Autophagic flux) 측정

[0057] 자가포식과정은 Professor T. Yoshimori (Department of Genetics, Graduate School of Medicine, Osaka University, Japan) 로부터 제공받은 mRFP-GFP-LC3 tandem vector를 사용하여 살아있는 세포에서 관찰하였다. 6cm 디쉬에서 배양한 세포를 mRFP-GFP-LC3 tandem vector로 48시간 동안 형질 감염시켰다. 형광 이미지는 LSM 780 또는 LSM800 (Carl Zeiss) 의 적절한 대물 렌즈를 사용하여 관찰하고 획득하였다.

[0058] 13. RNA 시퀀싱

[0059] 제조업체의 프로토콜에 따라 TRIzol 시약 (Invitrogen)을 사용하여 샘플에서 총 RNA를 추출하였다. Total mRNA-seq은 Macrogen (Seoul, South Korea) 에서 수행하였다.

[0060] 14. 대사분석

[0061] 세포 ($2-4 \times 10^6$) 를 10cm 플레이트에 접종하고 24시간 배양한 후, nutlin-3a를 24시간 동안 처리하였다. 내부 표준물질 (glutamine-d5, 1 µg/mL) 을 포함하는 얼음처럼 차가운 50% 메탄올을 사용하여 세포 대사체 추출을 위해 세포 펠렛은 액체 질소를 사용하여 동결/해동을 통해 용해했고, 용해물은 4°C에서 10분 동안 14,000rpm에서 원심분리하였다. 그 후 상층액을 UPLC-MS/MS 시스템에 주입하였다. AB Sciex Exion LC Series UHPLC (AB Sciex, Redwood City, CA, USA) 와 AB Sciex 4500 Triple Quad mass spectrometer (AB Sciex)로 구성된 LC-MS/MS 시스템을 사용하여 정량 분석을 수행하였다. HBP 대사산물의 크로마토그래피 분리는 hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) 컬럼을 사용하여 이루어졌으며 이동상은 구배 용출로 용출하였다. 대사산물을 검출하기 위해 음이온 모드에서 전자분무 이온화 소스가 장착된 AB Sciex 4500 Triple Quad 질량 분석기를 사용하였다. 모든 분석물은 다중 반응 모니터링으로 검출하였으며 모든 데이터 처리는 Analyst 소프트웨어(version 1.6.2, AB Sciex)를 사용하여 수행하였다.

[0062] 15. 생체 내 제브라피쉬 종양 모델

[0063] Zebrafish (*Danio rerio*) 실험 프로토콜은 지역 윤리위원회 (숙명여자대학교 동물관리위원회, SMWU-IACUC-1712-036)의 승인을 받고 수행하였다. 혈관 내피 세포가 녹색 형광을 발광하는 Tg (Flk1:EGFP) 제브라피쉬 배아를 사용하였다. 세포는 제조업체의 지침에 따라 형광 세포 추적기 CM-Dil (Thermo Fisher Scientific) (4ng/ml) 을 포함하는 Dulbecco's PBS에서 4분 동안 37°C에서, 15분 동안 4°C에서 배양한 후, 배아에 주입하기 위해 RPMI 1640에 재현탁하였다. Dechorionated된 제브라피쉬 배아는 0.003% tricaine (MilliporeSigma) 을 2 days post fertilization (dpf) 때 마취하여 약 100개의 세포를 각 배아의 yolk sac에 주입한 후 배아를 33°C로 유지하였다. 1dpi (day post-injection) 후, 배아에 7 µM의 nutlin-3a를 단독 투여하거나, 5일 동안 GlcNAc 40mM과 공동 처리하였다. 공초점 레이저 스캐닝 현미경 (LSM 700, Carl Zeiss) 을 사용하여 형광 현미경 사진을 얻었다. CM-Dil로 표지된 암세포가 침투한 면적을 Image J 소프트웨어 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) 를 사용하여 정량화하고 약물을 처리하지 않은 제브라피쉬 배아의 암세포로 정규화하였다.

[0064] 16. 생체 내 이중이식 마우스 모델

[0065] 모든 실험 절차와 동물 관리는 고려대학교 기관 동물 관리 및 사용 위원회 (IACUC no. KOREA-2021-0005) 에서 승인한 프로토콜에 따라 수행하였다. 세포 (1×10^7) 를 RPMI와 matrigel을 1:1로 혼합하여 7주된 BALB/c 누드

마우스 (Orient Bio, Korea)의 옆구리에 피하 주사하였다. 세포 주입 후, 이중 이식된 종양이 약 100mm^3 로 측정 되었을 때 nutlin-3a를 25mg/kg 또는 10% DMSO 농도의 PBS를 복강내 주입하였다. 주사는 2주 동안 격일로 시행 하였으며, 같은 날 전자 캘리퍼를 사용하여 종양 크기를 측정하였다.

17. 마우스 종양 조직 분석

마우스 종양 조직을 두 조각으로 나누고 질소에 동결하거나 고정하였다. 동결된 조직을 용해 완충액에서 균질화 하고 웨스턴 블롯에 사용하였다. 다른 조직 조각은 10% 중성 완충 포르말린에 고정하고 파라핀에 포매하였다. 제조업체의 프로토콜에 따라 H&E 또는 Ki67 (GA626, Dako Omnis)에 대한 1차 항체 및 HRP 표지 2차 항체 (Abcam)를 사용하여 조직을 염색하였다. Axio Scan Z1 (Carl Zeiss)을 사용하여 이미지를 분석하였다.

18. 통계 분석

최소 세 번의 독립적인 실험의 실험 결과는 평균 $\pm$ 표준 편차로 표시하였다. GraphPad Prism 9 소프트웨어 (GraphPad, CA, USA) 및 IBM SPSS 통계 (버전 25.0; IBM, NY, USA)를 통계 분석에 사용하였다. 두 개의 독립적 인 그룹을 비교하기 위해 양측 스튜던트 t-테스트를 수행했으며 여러 그룹을 비교하기 위해 ANOVA를 사용하였다. ANOVA로 얻은 p-value가 <0.05 인 경우 그룹 간 p-value를 Tukey의 HSD를 사용한 사후 분석과 비교 하였다. 유의성은 다음과 같이 정의되었다: # $0.05 < p$ (유의성 없음), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; $p < 0.05$ 는 유의미한 차이를 나타내는 것으로 간주하였다.

<실시예 1> KRAS-PI3K/Akt 경로를 통해 KRAS 돌연변이 NSCLC 세포의 생존력과 증식을 억제하는 Nutlin-3a

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide (MTT) 및 콜로니 형성 분석을 수행하여 nutlin-3a가 NSCLC 세포 및 정상 기관지 상피 세포 (BEAS-2B)의 생존 및 생존에 미치는 영향을 조사하였다. 정상 기관지 상피 세포 (BEAS-2B) 및 KRAS 야생형 폐암 세포주들 (HCC827, H1975, PC9, PC9GR, H820, H1299)과 달리, KRAS 돌연변이 NSCLC 폐암 세포주들 (A427, A549, H460)이 nutlin-3a에 민감함을 생존력 (도 1A)과 콜로니 형성 (도 1B)이 확연히 감소하는 것을 확인하였다. KRAS 돌연변이 NSCLC 폐암 세포에서 KRAS 신호전달에 대한 nutlin-3a의 효과를 이해하기 위해 KRAS 활성화 (도 1C)와 KRAS 하위 신호전달계 (도 1D)를 확인하였다. Nutlin-3a 처리는 KRAS 돌연변이 NSCLC 폐암 세포에서 전체 KRAS 및 KRAS-GTP 활성화 수준 뿐만 아니라 PI3K p110 α , p-Akt 및 c-MYC 수준을 감소시켰지만 p-MEK 및 p-ERK 수준은 감소시키지 않았다.

<실시예 2> 자가포식소체와 라이소좀의 융합을 방해하는 Nutlin-3a

Akt의 비활성화는 mTOR 신호를 억제하여 autophagy를 유도하는 것으로 알려져 있는데, KRAS 돌연변이 NSCLC 폐암 세포에서 PI3K/Akt 경로가 nutlin-3a에 의해 하향 조절되었기 때문에 mTOR 경로를 웨스턴 블롯으로 확인하였다. Nutlin-3a 처리는 p-mTOR 수준과 신호전달계를 감소시켜 자가포식을 유도하는 것으로 판단되었다(도 2A). 또한 자가포식 마커인 LC3와 p62의 수준을 nutlin-3a와 함께 bafilomycin을 처리하여 nutlin-3a가 autophagic flux에 미치는 영향을 웨스턴 블롯으로 조사하였다. Nutlin-3a만을 투여한 경우 LC3-II는 증가하고 p62는 감소 하였지만, KRAS 돌연변이 NSCLC 폐암 세포에서 bafilomycin A1과 nutlin-3a를 함께 투여한 결과 LC3-II와 p62가 모두 축적되었다(도 2B). 이러한 결과는 자가포식이 nutlin-3a에 의해 유도되었음을 시사한다. mRFP-GFP-LC3 플라스미드는 공초점 레이저 스캐닝 현미경으로 살아있는 세포에서 autophagic flux를 추가적으로 검증하는데 사용되었다(도 2C). 자가용해소체 (red puncta)가 아닌 자가포식소체 (yellow puncta)의 수만 nutlin-3a 처리로 증가했으며 이는 nutlin-3a가 자가포식소체와 라이소좀의 융합을 방해한다는 것을 나타낸다.

<실시예 3> 거대음세포 유래의 거대 공포를 형성하는 Nutlin-3a

광학현미경과 3D 홀로토포그래피 현미경을 통한 살아있는 세포 형태 관찰에서 nutlin-3a 처리 후 KRAS 돌연변이 NSCLC 폐암 세포인 A549 및 H460에서 거대한 세포질 공포 형성이 나타났지만 KRAS 야생형 세포에서는 그렇지 않았다(도 3A 및 도 3B). Nutlin-3a로 처리한 후 홀로토포그래피 현미경을 사용하여 촬영한 타임랩스 비디오는 거대 음세포 컵을 형성하는 주름진 원형질막과 시간이 지남에 따라 작은 공포가 합쳐져 거대한 공포를 형성하고 마침내 세포 파열로 이어지는 것을 보여주었다(도 3C). Nutlin-3a에 의해 유발된 세포질의 거대 공포 형성이 거대음 세포와 관련이 있는지, 최종적으로 분해를 위해 라이소좀과 융합하게 되는지에 대한 추가 분석을 실시하였다. 거대음세포작용을 확인할 수 있는 텍스트란을 배지에 첨가하고 LysoTracker로 염색한 후 공초점 레이저 스캐닝 현미경으로 살아있는 세포를 관찰하였다. Nutlin-3a로 처리된 세포는 LysoTracker와 융합되지 않고 텍스트란만 거대한 공포에 흡수하였다(도 3D). 또한 후기 엔도솜 마커인 Rab7과 LAMP1을 염색 후 공초점 레이저 스캐닝 현미경으로 관찰하였다. Rab7과 LAMP1 모두 거대한 공포 주위에 모집되었으며, 이는 nutlin-3a 유도로 발생한 공

포가 거대음세포작용 (macropinocytosis) 에서 비롯된 후기 엔도솜 특성을 가짐을 나타냈다(도 3E 및 도 3F). 액틴 세포골격은 Rac1 활성화가 마크로피노솜 형성 및 액틴 중합 (즉, 라멜리포디아 및 막 주름 형성과 같은 과정) 에 필요하기 때문에 Rac1 및 phalloidin의 면역형광염색을 통해 확인하였다. KRAS 돌연변이 NSCLC 폐암 세포에서, Rac1과 phalloidin은 막 외부에 응집되어 돌출부를 형성하고 nutlin-3a 처리 후 상향 조절된 Rac1 발현으로 주름을 형성하였다(도 3G 및 도 3H). 종합하면, nutlin-3a를 처리시 액틴 세포골격 리모델링이 유도되어 KRAS 돌연변이 NSCLC 폐암 세포에서는 거대음세포작용이 발생하지만 KRAS 야생형인 HCC827 및 BEAS-2B 세포에서는 그렇지 않음을 확인하였다.

[0076] <실시예 4> 메시오시스 유사 세포사멸을 유도하는 Nutlin-3a

[0077] Nutlin-3a 처리 시 생존능이 억제된 것을 확인한 KRAS 돌연변이 NSCLC 폐암 세포에서 caspase 의존적인 세포자멸사가 일어나는지 확인하기 위하여 caspases 9과 3 및 PARP의 절단 여부를 웨스턴 블롯으로 확인하였다(도 4A). 그 결과, 양성 대조군인 etoposide를 처리하였을 때와 달리, nutlin-3a 처리 시 caspases 9과 3 및 PARP가 절단되지 않음을 확인하였다. 이어서 pan-caspase 길항제인 Z-VAD (OMe)-FMK를 nutlin-3a와 함께 처리하였을 때, nutlin-3a로 인해 유도된 거대 공포 형성 및 세포사가 회복되지 않음을 통하여 nutlin-3a로 유도된 세포사가 caspase 비의존적이고 apoptotic하지 않다는 것을 시사한다(도 4B). Nutlin-3a로 유도된 세포사가 무엇인지 알아보기 위하여 세포에 ferrostatin-1 (ferroptosis inhibitor) 또는 necrostatin-1 (necroptosis inhibitor)을 nutlin-3a와 함께 처리하였지만 거대 공포 형성 및 세포사가 회복되지 않았다(도 4C 및 도 4D). 이는 nutlin-3a로 유도된 세포사가 caspase 의존적인 세포자멸사 및 ferroptosis나 necroptosis가 아님을 제시한다. 이후, 거대음세포작용의 길항제로 알려진 하위막 pH를 낮춤으로써 Rac1 신호전달을 억제하는 EIPA (Na⁺/H⁺exchangerinhibitor), EHT1864 (Rac family small GTPase inhibitor), 또는 bafilomycin A1 (Vacuolar H⁺ ATPase inhibitor)을 nutlin-3a와 함께 처리한 결과, 거대 공포 형성은 회복이 되었지만, 세포사는 회복되지 않음을 확인하였다(도 4E-I). 따라서, nutlin-3a에 의해서 형성된 거대음세포 유래의 거대 공포와 연관된 세포사멸은 메시오시스 또는 메시오시스 유사 세포사멸로 기존에 알려진 것과는 다른 기전에 의하여 유도됨을 시사한다.

[0078] <실시예 5> GFPT2 억제를 통해 핵소사민생합성 과정 (HBP) 조절하는 Nutlin-3a

[0079] RNA 시퀀싱 (RNA-seq)을 통해 nutlin-3a 표적 마커(들) 및/또는 KRAS 돌연변이 NSCLC 세포에 특이적인 경로를 확인하였다. 차등적으로 발현된 유전자 세트 (5,856개 유전자) 를 KRAS 돌연변이와 야생형 NSCLC 세포 및 BEAS-2B 세포에서 분석 진행하였다(데이터는 표시되지 않음). Nutlin-3a 처리시 KRAS 야생형 세포의 유전자와 비교하여 KRAS 돌연변이 NSCLC에서 상향 조절 및 하향 조절된 유전자 목록을 표시하기 위해 벤 다이어그램을 생성하였다. 이들 유전자 중 GFPT2, 즉 glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 2의 발현이 KRAS 돌연변이 NSCLC 세포에서만 유의하게 하향 조절되었으며 이는 RT-qPCR을 통해서도 확인되었다(도 5A). GFPT2는 UDP-N-아세틸글루코사민 (UDP-GlcNAc) 대사 과정에 관여하는 HBP로의 포도당 흐름을 조절하여 단백질의 N- 및 O-linked 글리코실화 및 O-GlcNAcylation (O-GlcNAc) 에 대한 전구체의 가용성을 조절한다. HBP 대사 산물의 수준은 UHPLC-MS/MS를 통해 확인되었으며, HBP 대사 산물의 양은 nutlin-3a로 처리한 후 상당히 감소한 것으로 나타났다(도 5B). UDP-GlcNAc를 기질로 사용하는 O-GlcNAc 및 N-글리코실화를 웨스턴 블롯을 이용하여 확인한 결과 KRAS 돌연변이 NSCLC 세포에서 nutlin-3a 처리 후 수준이 유의하게 감소한 것으로 나타났다(도 5C). 이러한 결과는 nutlin-3a가 KRAS 돌연변이 NSCLC 세포에서 GFPT2를 통해 HBP를 조절한다는 것을 나타낸다.

[0080] <실시예 6> HBP와 관련이 있는 Nutlin-3a에 의해 유발된 메시오시스 유사 세포 사멸

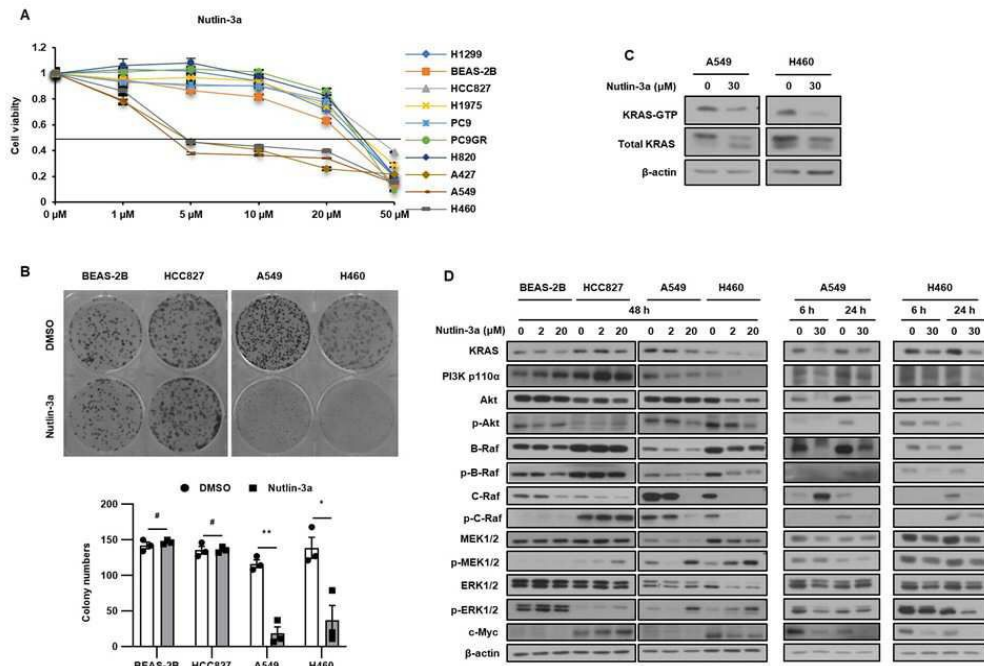
[0081] Nutlin-3a를 처리하면 GFPT2 억제를 통해 HBP의 하위신호체계 대사 산물의 양이 감소하므로, 하위신호체계의 HBP 대사산물인 GlcNAc 및 GlcN의 보충이 nutlin-3a 유도의 세포사멸을 회복시키는지 세포 계수 및 annexin V/PI 염색을 통해 확인하였다. GlcNAc 및 GlcN의 보충은 nutlin-3a에 의해 유도된 세포 증식 및 사멸을 회복시켰으며 (도 6A 및 도 6B), 이는 HBP가 KRAS 돌연변이 NSCLC 세포 생존에 필요함을 시사한다. 홀로토포그래피 현미경을 통한 세포 형태 관찰에서도 공포 형성이나 축적이 없는 것으로 나타났다(도 6C). 또한, 텍스트란 흡수 및 LysoTracker 염색을 통해 GlcNAc 보충이 nutlin-3a에 의해 유도된 거대음세포 형성을 감소시키는지 여부를 확인하였다. 대조군에서 관찰된 바와 같이, GlcNAc 보충은 텍스트란 흡수를 감소시켰다(도 6D). Nutlin-3a에 의해 유도된 자가포식 활성화 억제는 GlcNAc 보충에 의해 회복되었으며, 자가포식소체의 형성도 감소됨을 보여주었다 (도 6E). 이러한 결과는 HBP가 거대음세포 형성 및 거대음세포와 자가포식소체와 라이소좀의 융합과 관련이 있음을 나타냈다.

[0082] <실시예 7> Nutlin-3a 유도 세포 사멸의 표적인 GFPT2

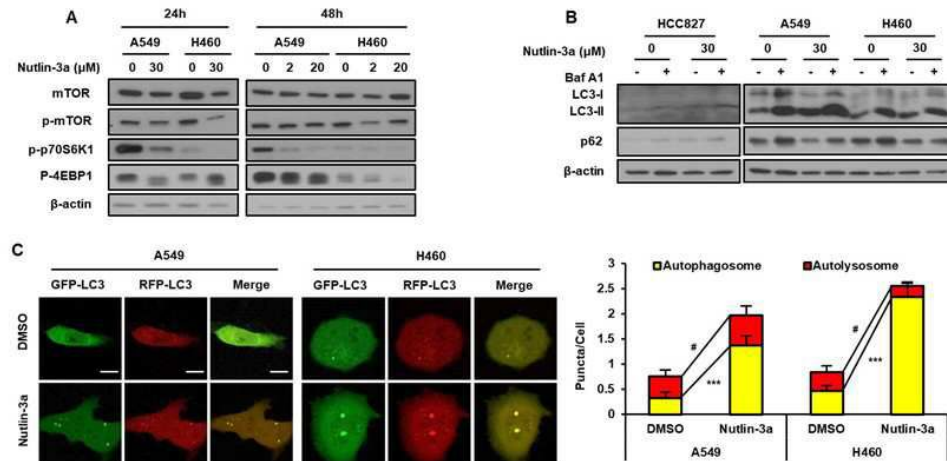
- [0083] HBP 효소인 GFPT2가 KRAS 돌연변이 NSCLC 세포에서 nutlin-3a의 표적임을 확인하기 위해 siGFPT2를 외인성으로 도입하여 녹다운(knockdown)하였다. O-GlcNAcylation, KRAS-PI3K/AKT-mTOR 경로 (도 7A 및 도 7B) 및 KRAS-GTP 활성화 (도 7C) 의 감소를 웨스턴 블롯을 통해 확인하였다. 세포 증식 및 생존력은 MTT 분석 (도 7D) 및 annexin V/PI 염색 (도 7E) 을 통해 측정하였다. GFPT2 억제제는 nutlin-3a 처리 후 나타난 바와 같이 caspase-3의존적 세포사 메커니즘의 방식으로 증식과 생존력을 모두 억제하였다(도 7F). 이러한 결과는 nutlin-3a의 표적 HBP의 GFPT2가 KRAS 돌연변이 NSCLC 세포의 생존력에 중요한 역할을 한다는 것을 나타낸다.
- [0084] <실시예 8> 생체 내에서 종양 성장을 억제하는 Nutlin-3a
- [0085] 제브라피쉬 및 마우스 이종이식 모델을 사용하여 *in vivo* 에서 nutlin-3a의 항암 효과를 조사하였다. CM-Dil 표지 (적색) 된 세포를 제브라피쉬 배아에 이식하고 DMSO, nutlin-3a 및/또는 GlcNAc와 함께 5일 동안 배양하였다. Nutlin-3a 처리는 두 세포 모두의 종양 면적을 감소시킨 반면, GlcNAc 보충은 이 효과를 회복시켰다(도 8A). 이러한 결과와 같이, nutlin-3a는 마우스 이종이식 모델에서도 종양 성장을 감소시켰는데(도 8B 및 도 8C), 이때 체중의 차이도 유발하지 않았다(도 8D). Nutlin-3a를 최종 처리 후, 마우스를 안락사시키고 종양 조직을 웨스턴 블롯 및 면역조직화학적 분석하였다. Nutlin-3a 처리 종양 조직에서 GFPT2 발현이 하향 조절되었고 p53 발현이 상향 조절되었다(도 8G). Ki67 염색을 통해 확인된 종양 증식도 nutlin-3a 처리 후 감소하였다(도 8E). 또한, H&E로 염색된 nutlin-3a 처리 종양 조직의 공포는 대조군에 비해 큰 공포의 형성을 보여 (도 8F), 생체 내 nutlin-3a의 항암 효과를 확인하였다.
- [0086] <실시예 9> PD-L1의 발현 감소를 유도하는 Nutlin-3a
- [0087] 핵소아민 생합성 과정의 대사 산물은 글라이코실화 (N-linked glycosylation, O-linked glycosylation) 및 세포 내 신호전달에 관여하는 오글루넥당화 (O-GlcNAcylation) 과정에 필요하기에, nutlin-3a를 통해 KRAS 돌연변이 폐암 세포에서 감소하는 핵소아민 생합성 과정의 대사가 PD-L1 단백질의 발현 조절에도 관여하는지 RT-qPCR과 western blot으로 확인한 결과, nutlin-3a가 KRAS 돌연변이 폐암 세포 H460에서 PD-L1의 RNA 및 단백질 발현을 감소시킨다는 것을 확인하였다 (도 9). A549는 PD-L1의 내인성 (endogenous) 발현량이 낮아 단백질의 발현을 확인하지 못하였다.
- [0088] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

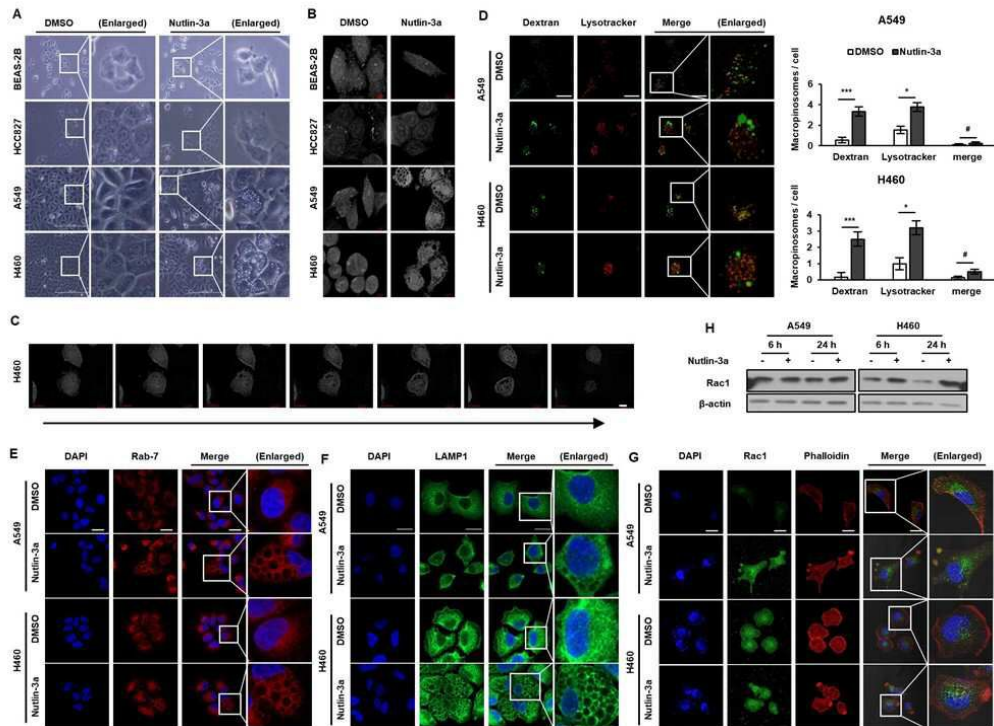
도면1



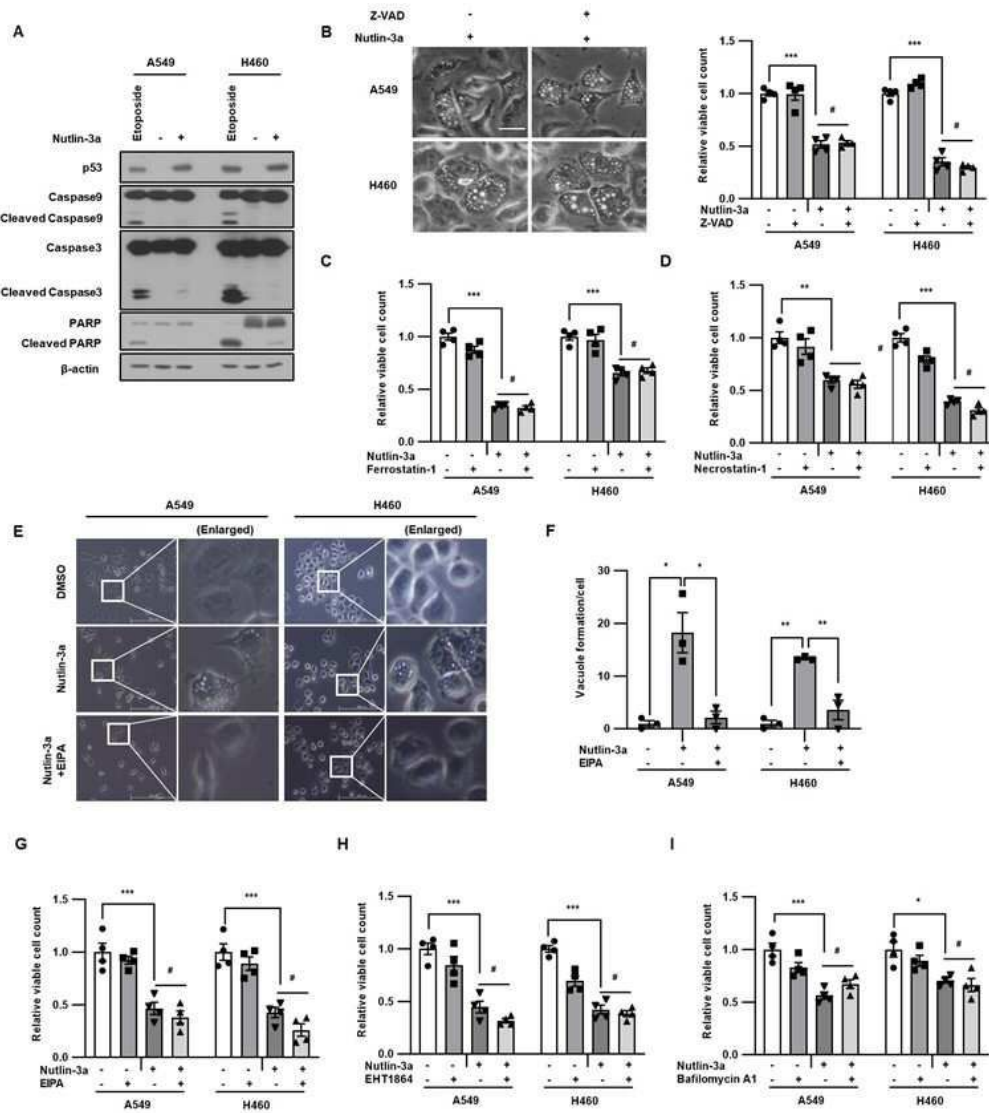
도면2



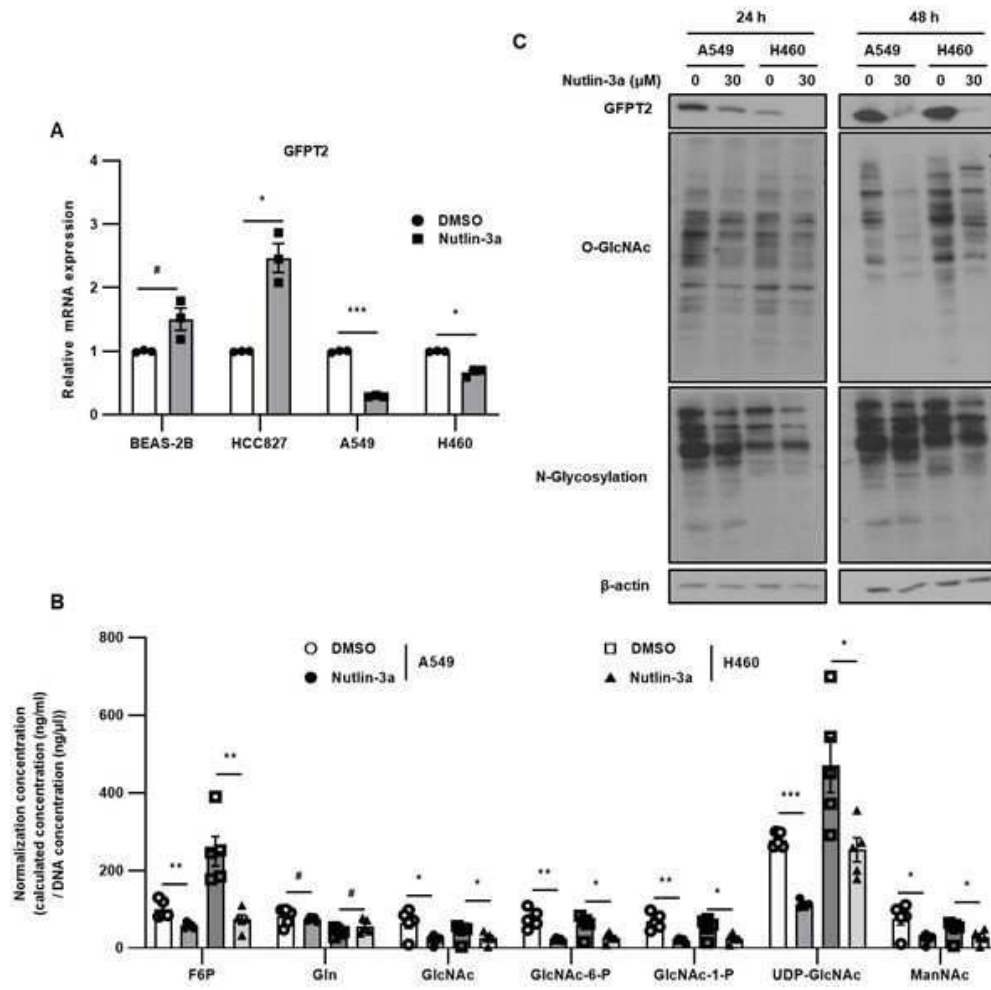
도면3



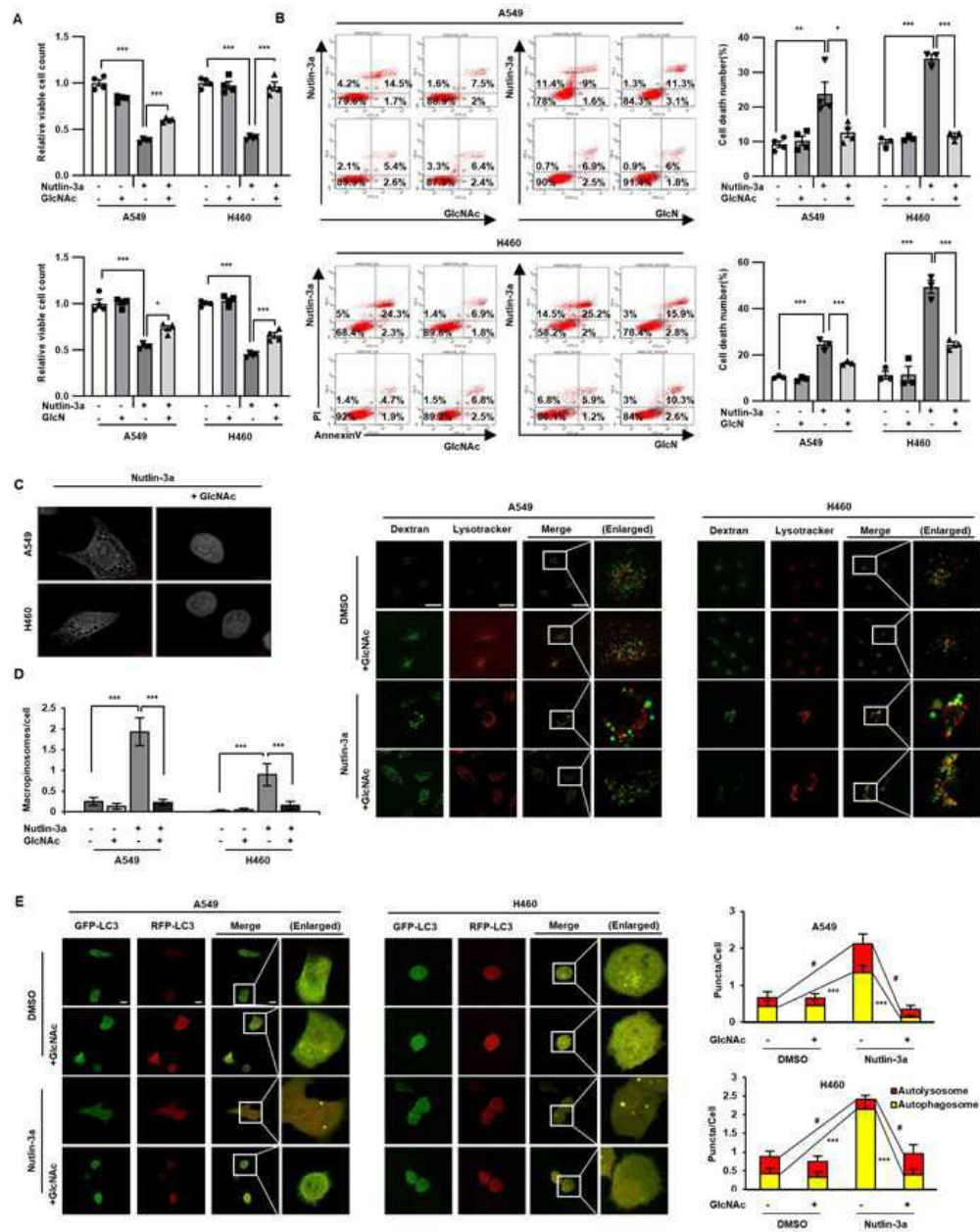
도면4



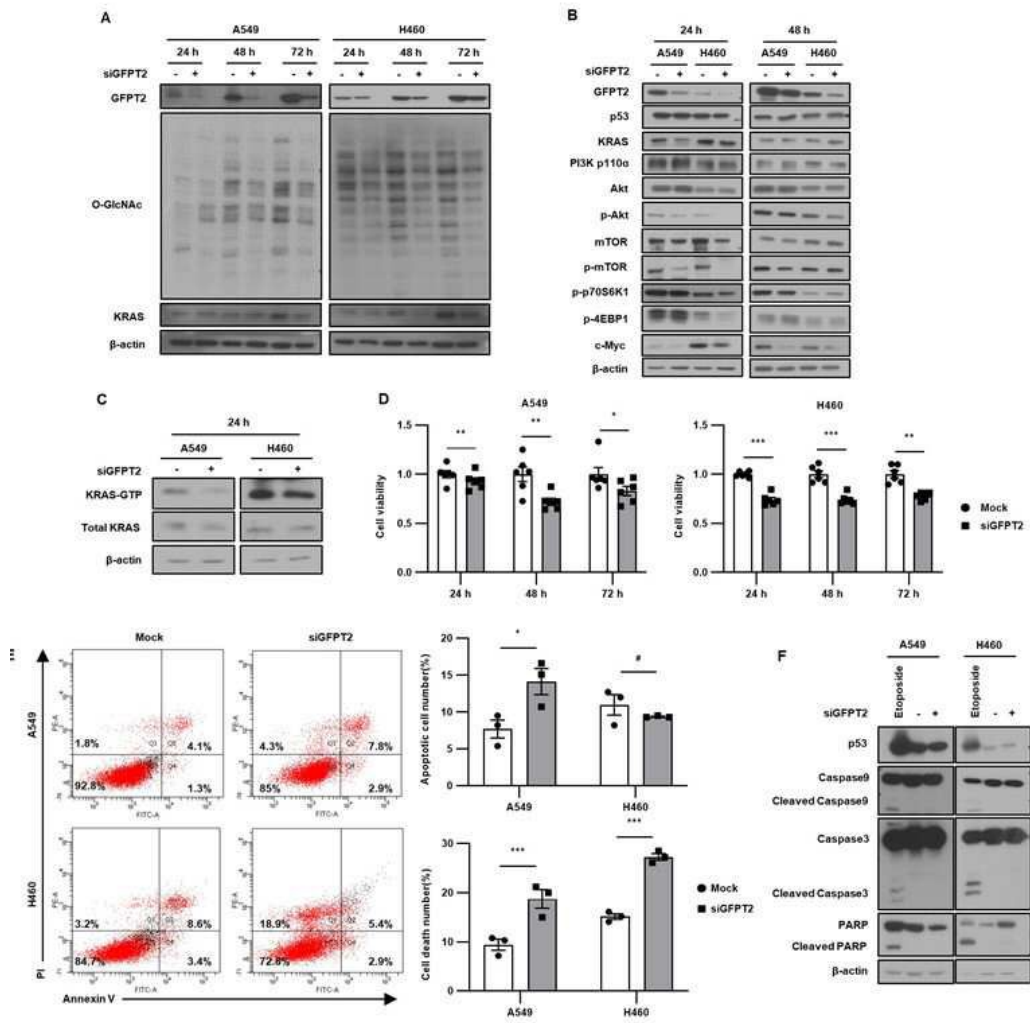
도면5



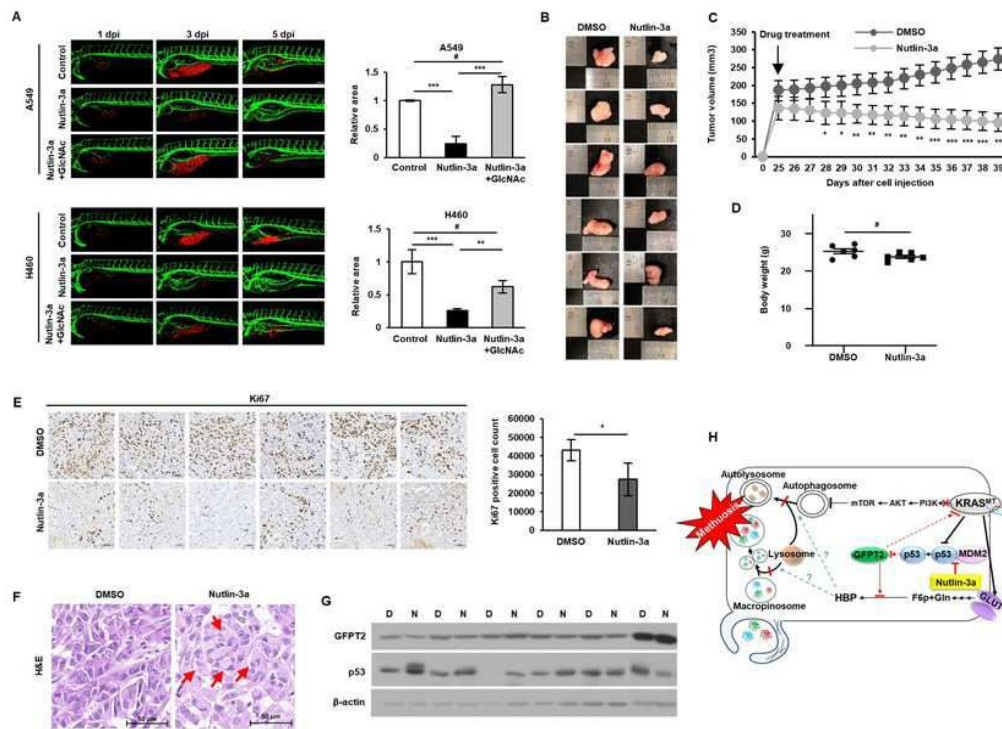
도면6



도면7



도면8



도면9

