

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2021년 8월 12일 (12.08.2021) WIPO | PCT



(10) 국제공개번호
WO 2021/158091 A2

(51) 국제특허분류:

A61K 39/395 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) C07K 16/24 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2021/001645

(22) 국제출원일: 2021년 2월 8일 (08.02.2021)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2020-0014454 2020년 2월 6일 (06.02.2020) KR

(71) 출원인: 아주대학교산학협력단 (AJOU UNIVERSITY
INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 16499 경기도 수원시 영통구 월드컵로 206, Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자: 박태준 (PARK, Tae-Jun); 13587 경기도 성남시 분당구 불정로 386번길 10 #601-1401, Gyeonggi-do (KR). 김장희 (KIM, Jang-Hee); 16294 경기도 수원시 장안구 송원로 131-28 #104-501, Gyeonggi-do (KR). 최용원 (CHOI, Yong-Won); 16853 경기도 용인시 수지구 성북1로 164번길 13 #210-1803, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 이처영 등 (LEE, Cheo Young et al.); 06210 서울시 강남구 인주로 430 16층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,

CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

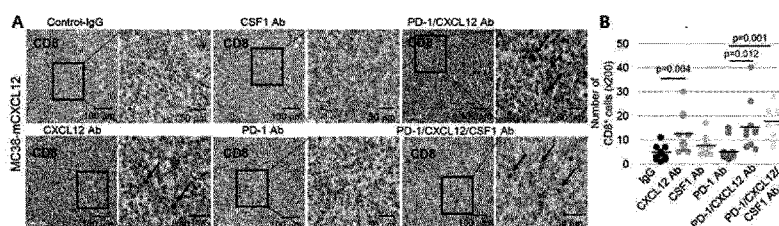
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도로 공개함 (규칙 48.2(g))

(54) Title: COMPOSITION COMPRISING CHEMOKINE INHIBITOR, COLONY STIMULATING FACTOR INHIBITOR, AND CANCER IMMUNOTHERAPY AGENT FOR PREVENTION OR TREATMENT OF CANCER AND COMBINATION THERAPY

(54) 발명의 명칭: 케모카인 억제제, 콜로니 자극 인자 억제제 및 면역항암제를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물 및 병용 요법



(57) Abstract: The present invention relates to a composition comprising a chemokine inhibitor, a colony stimulating factor inhibitor, and an cancer immunotherapy agent for treatment of cancer, and combination therapy, and more specifically, to a pharmaceutical composition comprising a CXCL12 inhibitor, a colony stimulating factor 1 (CSF1) inhibitor, and a cancer immunotherapy agent for prevention and/or treatment of cancer, wherein the pharmaceutical composition increases the infiltration and activity of CD8 cytotoxic T cells in cancers resistant to cancer immunotherapy agents, especially PD-1/PD-L1 immune checkpoint inhibitors, to effectively reduce tumor sizes and thus is useful for prevention and treatment of cancers resistant to immunotherapy agents, especially cancers overexpressing p16^{INK4A}.

(57) 요약서: 본 발명은 케모카인 억제제, 콜로니 자극 인자 억제제 및 면역항암제를 포함하는 암 치료용 조성물 및 병용 요법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 CXCL12 억제제, CSF1(colony stimulating factor 1) 억제제, 및 면역항암제를 포함하는 암의 예방 및/또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 상기 약학 조성물은 면역항암제, 특히, PD-1/PD-L1 면역관문억제제에 저항성을 가지는 암에서, CD8 cytotoxic T cell의 침윤 및 활성을 증가시킴으로써, 암의 크기를 효과적으로 감소시키며, 면역항암제 저항성 암, 특히 p16^{INK4A}을 과발현 하는 암의 예방 및 치료에 유용하다.



WO 2021/158091 A2

명세서

발명의 명칭: 케모카인 억제제, 콜로니 자극 인자 억제제 및 면역항암제를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물 및 병용 요법

기술분야

- [1] 본 발명은 케모카인 억제제, 콜로니 자극 인자 억제제 및 면역항암제를 포함하는 암 치료용 조성물 및 병용 요법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 CXCL12 억제제, CSF1(colony stimulating factor 1) 억제제, 및 면역항암제를 포함하는 암의 예방 및/또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 기존 항암제에는 암세포에게 약물로 독성을 주어 공격하는 제1세대 항암제로 불리는 화학 항암제(세포독성 항암제) 또는 암세포의 특정 표적인자만을 선택적으로 공격하는 치료제로서, 제2세대 항암제로 불리는 표적 항암제가 있다. 이러한 기존 항암제는 암세포뿐만 아니라 정상세포도 공격하거나 내성이 생겨 약효가 떨어지는 등의 부작용이 있다.
- [4] 최근에는 이러한 문제점을 해결하고 암을 효과적으로 치료하는 방법으로, 화학적 약물로 직접 암세포를 공격하기보다는 환자 면역세포가 암세포를 공격하도록 유도하는 등의 면역체계의 조절을 통해 암 치료의 한계를 극복하려는 연구들이 진행되고 있다. 이러한 연구를 기반으로 개발된 면역항암제는 면역항암제는 암세포가 획득한 면역억제 또는 면역회피 기전을 극복하기 위하여 면역체계의 중앙 인지능력 또는 파괴능력을 회복 또는 강화시키는 기전의 치료약제이다. 이들 면역항암제에는 면역체크포인트억제제, 면역세포치료제, 면역바이러스치료제 등이 있다.
- [5] 면역관문억제제(immune checkpoint inhibitor)는 기존 항암제를 대신할 면역항암제로, 인체가 가진 면역세포의 면역기능을 활성화 또는 비활성화 시키는 등 일정시간 동안 면역기능을 최대한 활성화시켜 인체의 방어기능을 최고로 작동하게 한다. 예를 들어, PD-1은 CD8 T 세포의 면역관문 또는 면역체크포인트(immune checkpoint) 단백질로, T 세포의 면역 활성을 조절한다. PD-1의 리간드인 PD-L1은 많은 종류의 상피암에서 과발현되어 있고, PD-L1이 CD8 T 세포의 수용체 PD-1과 결합하게 되면 CD8 T 세포의 암세포에 대한 공격능력을 떨어뜨리게 되는데, 이때 면역관문억제제를 투여하면 CD8 T 세포가 다시 활성화되어 암세포의 사멸을 유도할 수 있게 된다.
- [6] 하지만, 면역관문억제제 단독요법의 형태로 사용할 경우 내인성 내성 또는 선천성 내성의 원인으로 많은 환자가 치료에 반응하지 않거나, 초반에는 효과를 보이나 이후 획득 내성이 강해지는 문제 등이 발생한다. 일부 대장암에서도 이런

면역관문억제제에 대한 치료 저항성이 나타나 종양에 CD8 T 세포의 침윤이 감소되어 있는 등의 문제점이 발생하고 있으며, 저항성을 극복하기 위한 다양한 방법의 개발이 요구되고 있다.

[7]

[8] 최근, 면역항암제, 특히, 면역관문억제제 단독요법에 대한 저항성을 극복하려는 많은 시도가 있어왔다. 예를 들어, 대한민국 특허출원 제10-2019-7008792호에서, 항 PD-1 항체, STING 효능제, IL-15 초효능제 및 항-CD40 항체 등의 병용요법을 제시한 바 있으며, WO2016-201425에서는, 면역관문억제제와 CXCR4 항체의 병용요법을 제시한 바 있다. 그러나, 아직까지도 면역관문억제제 단독요법의 저항성을 극복하기 위한, 대체 방법 또는 병용 요법은 매우 부족하다.

[9]

[10] 한편, 면역항암요법을 사용한 치료에서 다양한 치료요법의 개발 외에, 중요한 요소는 실제 환자가 앓고 있는 암에 최적화된 치료요법의 사용이다. 암은 다양한 원인으로 인해 발생하며, 같은 위치에 발생한 암일지라도, 돌연변이 발생 위치, 종양 미세환경 등에 따라, 전이성, 저항성 등 상이한 특징을 나타낸다. 특히, 면역항암요법에 대한 단독 요법의 저항성을 극복하기 위해, 다양한 병용요법이 연구 개발되고 있다. 그러나, 충분한 효과를 얻기 위해서는 병용요법에 대한 분자 생물학적 근거를 규명하는 것이 매우 중요하며, 이를 통해 암의 다양한 마커 및 특성을 분별하고, 최적화된 치료요법을 개발 및 적용하는 것이 매우 중요하다

[11]

[12] 상기한 것과 같이, 면역항암제는 효과가 있는 경우에는 높은 완치율을 자랑할 정도로 극적인 효과를 나타내나, 효과가 없는 경우에는 전혀 효과가 없는 '모 아니면 도'식의 치료반응성을 나타낸다. 이러한, 치료반응성 또는 치료저항성의 예측방법은 거의 보고된 바 없으며, 특히, 암세포에서의 p16^{INK4A} 발현과 면역치료 저항성의 관련성은 보고된 바 없다.

[13]

본 발명자들은 대한민국 특허출원 제10-2019-0002873호에서, p16^{INK4A} 과발현 대장암에서 CXCL12 및 CSF1 유전자가 과발현 되는 것을 확인하고, 해당 유전자의 과발현으로 인한 면역항암제 저항성의 매커니즘을 밝혀, 면역항암제 치료 저항성 예측용 바이오마커에 대해 출원한 바 있다(미공개).

[14]

[15] 이러한 배경기술 아래에서, 본 발명자들은 면역항암제에 저항성을 가지는 암을 효과적으로 치료하기 위해 예의 노력한 결과, p16^{INK4A} 과발현 대장암에서 CXCL12 및 CSF1 유전자가 과발현되며, 해당 유전자의 과발현이 T세포 종양 침윤 감소 및 활성 감소 등을 통해 T 세포를 무력화함으로써, 암이 면역항암제 저항성을 획득하는 것을 확인하였다. 나아가, 상기 치료저항성 획득 기전을 기반으로, CXCL12 억제제, CSF1 억제제 및 면역항암제의 병용요법이 시너지

효과를 통해, 암, 특히 면역항암제에 저항성을 나타내는 암의 치료에 현저한 효과를 나타냄을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

[16]

[17] **발명의 요약**

[18] 본 발명의 목적은 CXCL12(C-X-C motif chemokine 12) 억제제, CSF1(colony stimulating factor 1) 억제제, 및 면역항암제를 포함하는 암의 예방 및/또는 치료용 약학 조성물을 제공하는데 있다.

[19] 본 발명의 다른 목적은 CXCL12(C-X-C motif chemokine 12) 억제제 및 CSF1(colony stimulating factor 1) 억제제와, 면역항암제 또는 면역치료요법과의 병용 요법을 제공하는데 있다.

[20] 본 발명의 또 다른 목적은, CXCL12 억제제 및 CSF1 억제제의 면역항암제와의 병용 투여 용도를 제공하는 데 있다.

[21] 본 발명의 또 다른 목적은, CXCL12 억제제, CSF1 억제제 및 면역항암제를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 및/또는 치료방법을 제공하는 데 있다.

[22] 본 발명의 또 다른 목적은,

[23] 개체에서 분리된 시료에서, p16^{INK4A}, CXCL12 및 CSF1으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 유전자 또는 이의 단백질의 발현 또는 활성 수준을 측정하는 단계;

[24] 상기 유전자 또는 이의 단백질의 발현 또는 활성 수준을 정상 대조군 시료의 해당 유전자 또는 이의 단백질의 발현 또는 활성 수준과 비교하여 개체의 면역항암제 저항성을 예측하는 단계; 및

[25] 상기 유전자 또는 이의 단백질의 발현 또는 활성 수준이 증가한 경우, CXCL12 억제제, CSF1 억제제 및 면역항암제를 병용 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 및/또는 치료방법을 제공하는 데 있다.

[26]

[27] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 CXCL12(C-X-C motif chemokine 12) 억제제, CSF1(colony stimulating factor 1) 억제제, 및 면역항암제를 포함하는 암의 예방 및/또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[28] 본 발명은 또한, CXCL12(C-X-C motif chemokine 12) 억제제 및 CSF1(colony stimulating factor 1) 억제제와, 면역항암제 또는 면역치료요법과의 병용 요법을 제공한다.

[29] 본 발명은 또한, CXCL12 억제제 및 CSF1 억제제의 면역항암제와의 암의 예방 및/또는 치료를 위한 병용 투여 용도를 제공한다.

[30] 본 발명은 또한, CXCL12 억제제 및 CSF1 억제제의 면역항암제와의 병용 투여를 통한 암의 예방 및/또는 치료 용도를 제공한다.

[31] 본 발명은 또한, CXCL12 억제제, CSF1 억제제 및 면역항암제의 암의 예방 및/또는 치료를 위한 병용 투여용 약학 조성물의 제조를 위한 용도를 제공한다.

- [32] 본 발명은 또한, CXCL12 억제제, CSF1 억제제 및 면역항암제를 개체에 병용 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 및/또는 치료방법을 제공한다.
- [33] 본 발명은 또한,
- [34] 개체에서 분리된 시료에서, p16^{INK4A}, CXCL12 및 CSF1으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 유전자 또는 이의 단백질의 발현 또는 활성 수준을 측정하는 단계;
- [35] 상기 유전자 또는 이의 단백질의 발현 또는 활성 수준을 정상 대조군 시료의 해당 유전자 또는 이의 단백질의 발현 또는 활성 수준과 비교하여 개체의 면역항암제 저항성을 예측하는 단계; 및
- [36] 상기 유전자 또는 이의 단백질의 발현 또는 활성 수준이 증가한 경우, CXCL12 억제제, CSF1 억제제 및 면역항암제를 병용 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 및/또는 치료방법을 제공한다.

[37]

도면의 간단한 설명

- [38] 도 1은 실시예1에 따른 대장암 샘플에서 p16^{INK4A}의 면역조직화학염색 결과이다.
- [39] 도 1A는 염색 세포비율에 따라 분류한 조직의 대표적인 면역조직화학염색 사진이다(0: 1% 미만; 1+: 1~20%; 2+: 20~40%; 및 3+: 40% 초과).
- [40] 도 1B는 120개의 샘플을 분류한 결과이다.
- [41] 도 2는 p16^{INK4A} 과발현 대장암에서의 CXCL12 및 CSF1 발현을 면역화학염색법으로 확인한 결과이다.
- [42] 도 2A는 면역화학염색법으로 확인한 p16^{INK4A} 및 CXCL12의 염색결과사진이다.
- [43] 도 2B는 면역화학염색법으로 확인한 p16^{INK4A} 및 CSF1의 염색결과사진이다.
- [44] 도 2C는 p16^{INK4A} 발현 수준에 따른 CSF1의 발현 변화를 확인한 그래프이다.
- [45] 도 3A는 대조군 종양세포(MC38) 및 CXCL12 과발현 종양세포(MC38-mCXCL12)를 마우스에 피하이식하고, 3주 후, 종양세포를 분리하여 촬영한 사진이다.
- [46] 도 3B는 각 마우스(N=10)의 대조군 종양세포(MC38) 및 CXCL12 과발현 종양세포(MC38-mCXCL12)의 종양크기를 나타낸 그래프(상단) 및 정규화한 그래프(하단)이다. 하단 그래프의 값은 평균 $\pm$ SD이다.
- [47] 도 3C 상단의 사진은 대조군 종양세포(MC38) 및 CXCL12 과발현 종양세포(MC38-mCXCL12)에서의 CD8 T 세포의 침윤을 확인한 것이다. 검은색 화살표는 CD8 T 세포를 나타낸다.
- [48] 도 3C 하단의 그래프는 대조군 종양세포(MC38) 및 CXCL12 과발현 종양세포(MC38-mCXCL12)를 체외 세포 배양접시에서 배양한 경우, 두 세포군의 성장 속도를 나타낸 것이다.
- [49] 도 3D는 대조군 종양세포(MC38) 및 CXCL12 과발현

종양세포(MC38-mCXCL12)에 침윤된 CD8 T 세포의 수를 계산하여 나타낸 것이다. 검은색 막대는 평균값을 의미한다.

- [50] 도 4A는 CSF1 항체, PD-1 항체 및 CSF1 항체를 단독 또는 조합하여 병용 투여하였을 때, CXCL12 과발현 종양세포(MC38-mCXCL12)에서 CD8 T 세포의 종양 내 침윤을 확인한 사진이다.
- [51] 도 4B는 CSF1 항체, PD-1 항체 및 CSF1 항체를 단독 또는 조합하여 병용 투여하였을 때, CXCL12 과발현 종양세포(MC38-mCXCL12)에 침윤된 CD8 T 세포의 수를 나타낸 것이다.
- [52] 도 5는 CSF1의 단핵구의 분화유도를 확인한 ELISA, 면역 염색 및 FACS 분석 결과이다.
- [53] 도 6A는 대조군 종양세포(MC38), CSF1 과발현 종양세포(MC38-CSF1) 및 CSF1 억제 종양세포(MC38-CSF1)를 마우스에 피하이식 한 뒤 관찰한 종양세포의 크기를 나타낸 사진 및 그래프이다.
- [54] 도 6B는 면역화학염색 분석 및 ELISA를 통해, 대조군 종양세포(MC38), CSF1 과발현 종양세포(MC38-CSF1) 및 CSF1 억제 종양세포(MC38-CSF1) 조직에서의 M2형 대식세포(CD206+) 분화 및 그랜자임 B(granzyme B, GZMB) 양성 T 세포 수를 분석한 결과이다.
- [55] 도 7A는 PD-1 항체, CXCL12 항체 및 CSF1 항체의 단독 투여 또는 병용 투여에 의한 종양 크기 감소를 확인하기 위한 동물 실험방법을 개략적으로 나타낸 것이다.
- [56] 도 7B는 CXCL12 과발현 종양세포(MC38-mCXCL12)를 이식한 쥐에서, PD-1 항체, CXCL12 항체 및 CSF1 항체의 단독 투여 또는 병용 투여한 경우의 종양 세포 크기를 나타낸 사진이다(n=10).
- [57] 도 7C는 CXCL12 과발현 종양세포(MC38-mCXCL12)를 이식한 쥐에서, PD-1 항체, CXCL12 항체 및 CSF1 항체의 단독 투여 또는 병용 투여한 경우의 종양 세포 크기를 나타낸 그래프이다(n=10).
- [58] 도 7D는 CXCL12 과발현 종양세포(MC38-mCXCL12)를 이식한 쥐에서, PD-1 항체, CXCL12 항체 및 CSF1 항체의 단독 투여 또는 병용 투여한 경우의 평균 종양 세포 크기를 나타낸 사진이다(n=10). 각 값은 평균 $\pm$ SD 값이다.
- [59] 도 8은 CXCL12 과발현 종양세포(MC38-mCXCL12)를 이식한 쥐에서, 대조군(IgG) 대비, PD-1 항체, CXCL12 항체 및 CSF1 항체의 단독 투여 또는 병용 투여한 경우의 종양 세포 크기 감소율(%)을 계산하여 나타낸 그래프이다(n=10). 각 값은 평균 $\pm$ SD 값이다.

[60]

[61] 발명의 상세한 설명 및 바람직한 구현예

[62] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된

명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[63]

[64] 암세포는 우리 몸의 면역체계의 감시를 회피할 수 있는 기전을 갖고 있다. 초반에는 면역체계가 암세포를 인지하고 공격할 수 있으나, 일정 시점이 되면 암세포의 면역감시 회피 기전을 통해 면역체계의 공격을 피해 성장하고 인체의 다른 부분으로 퍼져가게 된다. 면역항암제는 이렇게 암세포가 우리 몸의 면역체계로부터 회피하는 것을 억제하거나 면역세포의 작용을 강화하여 면역세포가 암세포를 더욱 효과적으로 공격할 수 있도록 한다. 면역항암제는, 1세대 화학항암제, 2세대 표적항암제에 이어 3세대 항암제로 불리며, 환자의 몸속 면역체계를 활용해 항암제 부작용이 거의 없고 생존기간도 길다는 장점이 있다.

[65] 하지만, 면역항암제 단독요법의 형태로 사용할 경우 내인성 내성 또는 선천성 내성의 원인으로 많은 환자가 치료에 반응하지 않거나, 초반에는 효과를 보이나 이후 획득 내성이 강해지는 문제가 있어, 이를 극복하기 위한 대체 요법 또는 병용 요법의 개발이 필요하다.

[66] 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명자들은 p16^{INK4A}이 과발현된 대장암에서 CXCL12 유전자 및 CSF1 유전자의 발현이 동시에 현저히 증가된 것을 확인하였으며, 다른 실시예에서, CXCL12 유전자 및 CSF1 유전자의 과발현 및 면역항암제 저항성 획득의 매커니즘을 밝혔다. 이와 상응하여, 현재 사용되는 면역관문억제제인 CTLA-4 억제제, PD-1 억제제 및 PD-L1 억제제 중에서 대장암을 주요 적응증으로 하는 면역관문억제제는 없다.

[67] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 암세포의 CXCL12 및 CSF1의 발현 향상에 의한 면역항암제 저항성 획득 매커니즘을 기반으로, 각 유전자의 발현 억제제와 면역관문억제제를 병용 투여하여 해당 암세포에 대한 치료 효과를 확인하였다. CXCL12 항체, CSF1 항체, 및 면역관문억제제(PD-1 항체)를 병용하여 투여하는 경우에, 면역관문억제제 단일 투여시보다 330%이상, 면역관문억제제 및 CXCL12의 병용 투여 시보다 150%이상 종양세포의 크기 감소 효과가 향상되어, 종양의 크기가 70%에서 99%까지 감소하는 것을 확인하였으며, CXCL12 억제제, CSF1 억제제, 및 면역항암제의 병용투여가 시너지 효과를 통해 극적인 면역항암제 저항성 암의 치료효과의 향상을 나타내는 것을 입증하였다.

[68]

[69] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, CXCL12(C-X-C motif chemokine 12) 억제제, CSF1(colony stimulating factor 1) 억제제, 및 면역항암제를 포함하는 암의 예방 및/또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[70] 본 발명은 또 다른 관점에서, CXCL12 억제제, CSF1 억제제 및 면역항암제의 암의 예방 및/또는 치료를 위한 병용 투여용 약학 조성물의 제조를 위한 용도에 관한 것이다.

[71] 본 발명은 다른 관점에서, CXCL12(C-X-C motif chemokine 12) 억제제 및

CSF1(colony stimulating factor 1) 억제제와, 면역항암제 또는 면역치료요법과의 병용 요법에 관한 것이다.

[72] 본 발명은 또 다른 관점에서, CXCL12 억제제 및 CSF1 억제제의 면역항암제와의 병용 투여 용도에 관한 것이다.

[73] 본 발명은 또 다른 관점에서, CXCL12 억제제 및 CSF1 억제제의 면역항암제와의 병용 투여를 통한 암의 예방 및/또는 치료 용도에 관한 것이다.

[74] 본 발명은 또 다른 관점에서, CXCL12 억제제, CSF1 억제제 및 면역항암제를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 및/또는 치료방법에 관한 것이다.

[75] 본 발명은 또 다른 관점에서, 다음의 단계를 포함하는 암의 예방 및/또는 치료방법에 관한 것이다:

[76] (a) 개체에서 분리된 생물학적 시료에서, p16^{INK4A}, CXCL12 및 CSF1으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 유전자 또는 이의 단백질의 발현 또는 활성 수준을 측정하는 단계;

[77] (b) 상기 유전자 또는 이의 단백질의 발현 또는 활성 수준을 정상 대조군 시료의 해당 유전자 또는 이의 단백질의 발현 또는 활성 수준과 비교하여 개체의 면역항암제 저항성을 예측하는 단계; 및

[78] (c) 상기 유전자 또는 이의 단백질의 발현 또는 활성 수준이 증가한 경우, CXCL12 억제제, CSF1 억제제 및 면역항암제를 병용 투여하는 단계

[79]

[80] 본 발명의 용어, "CXCL12(C-X-C motif chemokine 12)"는 "간질 세포 유래 인자 1(Stromal cell-derived factor 1, SDF1)"로도 불리며, C-X-C 케모카인 수용체 CXCR4의 리간드로 CXCR4와 상호작용하는 것으로 알려져 있으며, CXCR7(RDC1)의 리간드로도 보고된 바 있다. CXCL12는 심장, 간, 비장, 신장, 뇌, 골격근, 내피 세포, 상피 조직, 줄기 세포 등 다양한 조직 유형에서 광범위하게 발현될 수 있다. CXCL12의 활성은 배아 발생, 세포 사멸 및 생존, 면역 반응, 조직 항상성, 혈관 신생, 칼슘 이온 항상성, 세포 증식 및 이동, 종양 성장 및 전이 등을 포함하는 세포 기능과 관련된다. CXCL12는 림프구에 대해 강한 화학 주성이며, CXCR4 의존적 매커니즘을 통해 골수로부터 내피 전구체 세포를 모집함으로써 혈관 신생에서 중요한 역할을 한다. 또한 CXCR4+ 종양 세포의 전이가 CXCL12를 고도로 발현하는 림프절, 폐, 간 및 뼈와 같은 기관으로의 전이를 유도하는 데 관여하는 것으로 알려져 있다.

[81] 본 발명의 용어 "CSF1"은 대식세포 콜로니 자극 인자(macrophage colony-stimulating factor; M-CSF)로도 알려져 있으며, 조혈 줄기 세포를 대식세포 또는 다른 관련 세포 유형으로 분화시키는 분비 시토카인이다. 또한, 일반적으로 전핵 세포는 M-CSF를 세포간(intercellular) 바이러스 감염에 대항하기 위해 M-CSF를 생산 및 분비하며, 분비된 MCSF는 CSF1 수용체에 결합하여 세포 내 신호 전달 경로를 활성화 한다. 상기 CSF1은 단핵 세포, 대식 세포 및 골수 전구 세포의 증식, 분화 및 생존에 관여한다.

[82]

[83] 본 발명의 일 실시예에서, 면역항암제 저항성 암세포, 특히, p16^{INK4A}를 과발현하는 암세포에서 CXCL12 유전자 및 CSF1 유전자의 발현이 증진되어 있는 것을 확인한 바 있다. 나아가, 암세포에서 CXCL12 유전자의 과발현이 CD8 cytotoxic T cell의 침윤을 억제하고, CSF1 유전자의 과발현이 M2형 대식세포의 분화에 관여하여 세포독성 T 세포의 활성을 감소시킴으로써, 면역항암제 저항성을 획득하는 것을 확인하였다.

[84] 본 발명에 있어서, 상기 CXCL12 억제제는 CXCL12 유전자 발현 억제제 또는 CXCL2 단백질 활성 억제제인 것을 특징으로 할 수 있다.

[85]

[86] 본 발명에 있어서, 상기 CSF1 억제제는 CSF1 유전자 발현 억제제 또는 CSF1 단백질 활성 억제제인 것을 특징으로 할 수 있다.

[87]

[88] 본 발명의 용어 "유전자 발현 억제제"는 표적 유전자가 전사 및 번역을 통해 발현되는 것을 억제 또는 저해하는 모든 제제를 의미한다. 표적 유전자 특이적으로 발현을 억제하는 모든 유형의 제제가 포함될 수 있으며, 전사단계의 조절 및 RNAi와 같은 전사 후 번역 조절에 의한 억제제를 모두 포함한다. 상기 유전자 발현 억제제는 예를 들어, 안티센스 뉴클레오타이드(antisense nucleotide), siRNA(small interfering RNA), shRNA(small hairpin RNA), 리보자임(ribozyme), 압타머(apptamer), anti-microRNA, MicroRNA mimic, Zinc Finger Nucleases(ZFNs) 및 Transcription activator-like effector nucleases (TALENs)와 같은 뉴클라아제, CRISPR-Cas9 시스템 제제(예, gRNA, sgRNA), polycistronic tRNA-gRNA 시스템 제제, 이용한 self-ribozyme-flanked RNAs 등이 있으나(Gao & Zhao 2014, Xie et al. 2015, Zetsche et al. 2017), 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명에서 상기 표적 유전자는 CXCL12 유전자 또는 CSF1 유전자이다.

[89] 상기 안티센스 뉴클레오타이드는 DNA, 미성숙-mRNA 또는 성숙된 mRNA의 상보적 염기서열에 결합(혼성화)하여 DNA에서 단백질로서 유전정보의 흐름을 방해하는 것이다. 상기 siRNA는 안티센스와 작동 원리는 유사하나 21~25개의 뉴클레오타이드가 연결된 두 가닥(double strand)으로, RNase H가 아닌 RISCs(RNA-induced silencing complexes)라는 효소복합체를 통해 mRNA를 파괴한다. 상기 CRISPR-Cas9(크리스퍼 유전자 가위)은 특정 염기서열을 인지해 해당 부위의 DNA를 절단하는 제한효소로 작용한다.

[90] 본 발명의 용어 "단백질 활성 억제제"는 표적 단백질의 활성을 억제 또는 저해하는 모든 제제를 의미한다. 상기 단백질 활성 억제제는 표적단백질의 활성을 직접적으로 억제하거나, 다른 단백질과의 상호작용을 방해하여, 기능을 억제하는 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 단백질 활성 억제제는 예를 들어, 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 모방체, 기질 유사체, 압타머 및 항체 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명에서 상기 표적

단백질은 CXCL12 단백질 또는 CSF1 단백질이다.

- [91] 상기 화합물은 표적 단백질에 특이적으로 결합하여 이의 활성을 억제할 수 있는 임의의 화합물을 모두 포함한다. 상기 앵타머(aptamer)는 단일 사슬 DNA 또는 RNA 분자로서, SELEX(systematic evolution of ligands by exponential enrichment)라 불리는 올리고 뉴클레오티드 (oligonucleotide) 라이브러리를 이용한 진화적인 방법에 의해 특정 화학 분자나 생물학적 분자에 높은 친화력과 선별력을 갖고 결합하는 올리고머를 분리하여 수득할 수 있다. 앵타머는 표적 단백질에 특이적으로 결합하고 표적 단백질의 활성을 조절할 수 있는데, 예컨대, 결합을 통하여 표적 단백질의 활성을 차단할 수 있다. 상기 항체는 하나 이상의 상보성 결정 영역을 포함하는 항체 단백질 분자의 집합, 하나의 항체 단백질 분자, 결합 단편 또는 이의 유도체를 의미한다.
- [92] 본 발명에 있어서, 상기 "억제제"는 "길항제(antagonist)" 또는 "저해제"와 상호호환적으로 사용될 수 있다.
- [93] 본 발명의 용어 "표적 단백질", "표적 유전자", "표적으로 하는" 등에서 사용되는 "표적"은 활성을 조절하고자 하는 대상을 의미하며, 특히 본 발명에서, 억제제는 표적으로 하는 대상 유전자의 발현 또는 활성을 조절할 수 있는 것을 특징으로 한다.
- [94] 본 발명의 일 실시예에서, CXCL12 억제제 및 콜로니 자극 인자 1 억제제는 각각 항-CXCL2 항체(Merck, Darmstadt, Germany, clone K15C) 및 항-CSF1 항체(BioXcell, clone 5A1)를 사용하였다.
- [95]
- [96] 본 발명의 일 실시예에서, 면역관문억제제(PD-1 억제제)와 CXCL12 억제제 및 CSF1 억제제의 병용효과를 확인하였다.
- [97] 그러나, 본 발명의 다른 실시예에서 확인한 것과 같이, p16^{INK4A}을 과발현하는 암의 치료저항성이 CXCL12 및 CSF1의 과발현에 의한 T 세포의 증양 침윤 및 활성을 감소를 통해 획득되는 것을 고려하면, 사용된 면역관문억제제뿐만 아니라, T 세포를 이용한 면역치료요법 또는 면역항암제와 병용하여 사용하는 경우에 본 발명의 실시예에서 확인한 것과 같은 현저한 치료효과 증진효과를 얻을 수 있다.
- [98] 따라서, 본 발명에 있어서, 상기 면역항암제는 T 세포의 면역활성을 조절하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [99] 본 발명에 있어서, 바람직하게는 상기 면역항암제는 면역관문억제제(immune checkpoint inhibitor) 또는 면역세포치료제(immune cell therapy)인 것을 특징으로 할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 면역관문억제제인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [100] 본 발명에 있어서, 상기 면역관문억제제는 A2AR, B7-H3(CD276) 또는 B7-H3 수용체, B7-H4(VTCN1) 또는 B7-H4 수용체, BTLA(CD272), CTLA-4(CD152), IDO, KIR, LAG3, NOX2, PD-1, PD-L1, PD-L2, TIM3, VISTA 및 SIGLEC7으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 면역관문을 표적으로 하는 것을

특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 T세포 면역관문 억제제, 더욱 바람직하게는 PD-1 억제제 또는 PD-L1 억제제와 같은 PD-1/PD-L1 경로 억제제, 가장 바람직하게는 PD-1 억제제인 것을 특징으로 할 수 있다.

- [101] 본 발명에 있어서, 상기 면역세포치료제는 수지상세포 면역치료제, LAK세포 면역치료제, T 세포 기반 면역 치료제 및 NK 세포 기반 면역치료제로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [102] 본 발명에 있어서, 상기 면역세포치료제는 바람직하게는 T 세포 기반 면역치료제인 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 T 세포 기반 면역 치료제는 종양침윤 T 세포(TIL), T 세포수용체 발현 T 세포(TCR-T), 키메릭 항원 수용체 발현 T 세포(CAR-T)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [103] 본 발명의 용어 "면역항암제"는 암 자체를 공격하는 기존 항암제와는 달리 인공면역 단백질을 체내에 주입하여 면역체계를 자극함으로써 면역세포가 선택적으로 암세포만을 공격하도록 유도하는 치료 제제를 의미한다. 암세포가 획득한 면역억제 또는 면역회피 기전을 극복하기 위하여 면역체계의 중앙 인지능력 또는 파괴능력을 회복 또는 강화시키는 기전의 약제라 할 수 있다. 상기 면역항암제는 수동면역치료를 사용되는 것과 능동면역치료를 사용되는 것으로 구분할 수 있다. 수동면역치료에는 면역체크포인트억제제(immune checkpoint inhibitor), 면역세포치료제(immune cell therapy), 치료용 항체(therapeutic antibody) 등이 있으며, 능동면역치료에는 암치료 백신(vaccine), 면역조절제(immune-modulating agents) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 면역항암제와 관련하여, 약학정보원에서 발간한 이슈&트렌드 면역항암제에 잘 기재되어 있다.
- [104] 본 발명의 용어 "면역관문"은 "면역 체크포인트"로도 불리우며, 면역 세포의 활성을 조절하는 분자를 의미한다. 면역관문은 면역계가 세포를 무차별적으로 공격하는 것을 방지하는 자기 내성을 위해 존재한다. 상기 면역관문은 면역활성을 증진시키는 자극성 면역관문(Stimulatory checkpoint) 및 면역활성을 낮추는 억제성 면역관문(Inhibitory checkpoint)으로 분류할 수 있다. 일부 암은 억제성 면역관문을 표적으로 하여, 스스로를 면역반응으로부터 보호한다.
- [105] 본 발명의 용어 "면역관문억제제"는 면역 세포 억제에 관여하는 표적 면역관문 단백질(immune checkpoint protein)의 활성을 차단하여 면역 세포를 활성화시켜 암세포를 공격하는 약제이다. 면역관문억제제의 표적이 될 수 있는 면역관문으로는 PD-1, PD-L1, CD80, CD86, CTLA4, B7-H3, -H4, -H5, BTLA, 4-1BB, Tim-3, TIGIT, CD94/NKG2A, KIR2DL-1, -2, -3, 등이 있으며, 현재 임상적으로 사용되는 면역관문억제제의 표적은 PD-1, PD-L1, CTLA4 이다. 더욱 구체적으로, 현재 임상적으로 사용되는 면역관문억제제로는 CTLA-4 단클론항체로 이필리무맙(ipilimumab), 트레멜리무맙(Tremelimumab) PD-1 단클론항체로 니볼루맙(nivolumab), 펌브롤리주맙(pembrolizumab), PD-L1 단클론항체로 아테졸리주맙(atezolizumab), 두르발루맙(durvalumab),

아벨루맵(Avelunab) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [106] 본 발명의 용어 "면역세포치료제(immune cell therapy)"는 체내의 면역세포를 채집하여 강화시키거나 유전공학적으로 변형시켜 다시 넣어주는 세포치료제를 의미한다. 면역세포치료제를 이용한 치료법을 적응(입양)세포치료(adoptive cell transfer, ACT)라 한다. 면역세포치료제에 사용되는 면역세포에는 세포 내로 도입하는 유전자의 특징에 따라 수지상 세포(dendritic cell), 림포카인활성세포(lymphokine activated killer, LAK), T 세포(lymphocyte)가 있고, 다시 T세포는 종양침윤 T 세포(tumor-infiltrating T lymphocyte, TIL), T 수용체 발현 T 세포(T cell receptor-modified T cell, TCR-T), 키메라 항원수용체 발현 T 세포(chimeric antigen receptor-modified T cell, CAR-T) 등으로 구분한다. 면역세포치료제에 사용되는 면역세포에 따라, 수지상세포 면역치료제, LAK세포 면역치료제, T 세포 기반 면역 치료제, NK 세포 기반 면역치료제 등으로 구분되기도 하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [107] 면역세포치료제에 해당하는 임상 약제로는 Sipuleucel-T(Provenge®), Autologous dendritic cells(제품명: 크레아박스 알씨시 주, Creavax-RCC®, 제이더블유크레아젠), Activated T lymphocytes (제품명: 이문셀 -엘씨 주, Immunecell-LC®, 녹십자), Tisagenlecleucel(티사젠렉류셀, 제품명: 킴리아 주, Kymriah®, 노바티스) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [108] 본 발명의 일 실시예에서, p16^{INK4A} 유전자가 과발현된 암세포가, CXCL12 및 CSF1을 과발현하고, 각각의 T세포 작용 억제 매커니즘을 통해 면역항암제 저항성을 획득하는 것을 확인하고, 본 발명을 완성한 것이다.
- [109] 따라서, 본 발명에 있어서, 상기 면역관문억제제 또는 면역세포치료제는 T 세포 관련 면역반응의 활성화를 기반으로 하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 세포독성 T 세포 또는 CD8 T 세포의 활성화를 기반으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [110]
- [111] 본 발명의 용어 "CTLA-4"는 CD28과 유사한 구조를 가지고 있는 항원으로 T 세포가 활성화되었을 때 일과성으로 발현되는 T 세포 활성 항원의 일종이다. T 세포가 활성화되어 면역반응을 나타내기 위해서는 항원제시세포(APC)가 T 세포에 MHC와 B7.1/B7.2(CD80/CD86)와 같은 두 신호를 보내 결합하여야 한다. 이때 CTLA-4가 B7와 결합하면 T 세포의 기능이 차단되고 T 세포의 암세포에 인지기능과 사멸작용이 차단된다. 이때 CTLA-4 억제제는 CTLA-4 수용체와 결합하여 T 세포가 무력화되는 것을 막고 T 세포의 증식을 증가시켜 활성화시킨다.
- [112] 본 발명의 용어 "PD-1" 및 "PD-L1"은 CD8 T 세포의 면역활성을 조절하는 면역관문과 관련된 단백질로, PD-L1은 PD-1의 리간드에 해당한다. PD-L1은 주로 암세포의 표면에 발현되는 면역 회피물질로서, PD-L1이 PD-1과 결합하면, T 세포가 기능을 상실하고 사멸하게 된다. PD-1 억제제 및 PD-L1 억제제는 각각

PD-1 및 PD-L1의 발현을 억제하거나, 상호작용을 억제하여 PD-1/PD-L1 면역회피신호 경로를 차단함으로써, T세포가 암세포를 사멸시키도록 한다.

[113] 본 발명에 있어서, 상기 CXCL12 억제제, CSF1 억제제 및 면역항암제는 각각 하나 이상의 종류를 포함할 수 있다.

[114]

[115] 본 발명의 용어 "p16^{INK4A}"은 p16, 사이클린 의존성 카이네이즈 억제제 2A, CDKN2A, 다중 종양 억제자 1(multiple tumor suppressor 1) 등으로도 불리우며, G1기에서 S기로 세포주기의 진행을 늦춤으로써, 세포분열을 늦춰 종양 억제자로 작용하는 단백질이다. p16^{INK4A}은 암의 억제성 물질로서, 유전자 결실 등에 의해 충분히 발현되지 않거나, 기능이 감소 또는 상실되는 경우, 세포주기를 가속화하고 많은 유형의 암을 유발하는 것으로 알려져 있다. p16^{INK4A}가 과발현되는 임상적 의의가 있다고 알려져 있는 암종은 유방암, 담낭암, 위장관 기질 종양, 흑색종, 고악성도 별아교세포종 등이 있다.

[116] 본 발명의 일 실시예에서, p16^{INK4A}의 종래 보고된 역할에서 탈피하여, p16^{INK4A}의 발현 정도에 비례하여, CD8 T 세포의 암 조직 내 침윤이 감소되어 p16^{INK4A}의 발현과 면역항암제에 저항성 사이의 상관관계를 확인하였으며, p16^{INK4A} 과발현 암세포에서, CXCL12 및 CSF1이 과발현되고, 이에 의해 CD8 T 세포의 암세포 내 침윤 및 대식세포 분화에 영향을 미쳐 면역항암제 저항성을 획득함을 확인하였다.

[117] 따라서, 본 발명에 있어서, 상기 암은 면역항암제에 저항성을 갖는 것을 특징으로 할 수 있다.

[118] 본 발명에 있어서, 상기 암은 면역관문억제제에 저항성을 갖는 것을 특징으로 할 수 있다.

[119] 본 발명에 있어서, 상기 암은 p16^{INK4A}, CXCL12 및 CSF1으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 유전자가 발현이 정상세포에 비해 증가된 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 p16^{INK4A}의 발현이 정상세포에 비해 증가된 것을 특징으로 할 수 있다.

[120] 예를 들어, 상기 암은 p16^{INK4A}가 과발현되는 임상적 의의가 있는 암일 수 있으며, 바람직하게는 대장암, 유방암, 담낭암, 위장관 기질 종양, 흑색종 및 고악성도 별아교세포종으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 대장암인 것을 특징으로 할 수 있다.

[121] 본 발명에 있어서, 상기 약학 조성물은 CXCL12 억제제, CSF1 억제제 및 면역항암제를 포함하는 암의 예방 및/또는 치료를 위한 병용 투여용 약학 조성물인 것을 특징으로 할 수 있다.

[122] 본 발명에 있어서, 상기 병용 투여용 약학 조성물은 CXCL12 억제제, CSF1 억제제 및 면역항암제가 혼합된 혼합제를 포함하는, 세 약물의 동시 투여를 위한 형태일 수 있다.

[123] 본 발명에 있어서, 상기 약학 조성물은 CXCL12 억제제, CSF1 억제제 및

면역항암제가 각각 제제화되어, 세 약물을 동시적 또는 순차적으로 투여하기 위한 형태일 수 있다. 이 경우, 상기 병용 투여용 약학 조성물은 유효 성분으로 CXCL12 억제제, CSF1 억제제 및 면역항암제 중 어느 하나 또는 둘을 포함하는 제1 약학 조성물 및 나머지를 포함하는 제2 약학 조성물을 포함하는, 동시적 또는 순차적 투여를 위한 병용 투여용 약학 조성물일 수 있다. 순차적 투여의 경우 그 순서는 서로 바뀌어도 무방하다.

[124]

[125]

[126] 본 발명의 용어, "예방"이란, 본 발명의 약학 조성물을 암 의심 개체에 투여하여 암의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미할 수 있다.

[127] 본 발명의 용어, "치료"란, 본 발명의 약학 조성물을 암 발병 개체에 투여하여 상기 질환의 증세가 호전되도록 하거나 이롭게 되도록 하는 모든 행위를 의미할 수 있다.

[128] 본 발명에서 사용되는 용어, "개체"란, 암, 바람직하게는 면역항암제에 저항성을 가지는 암이 발병되었거나 발병할 가능성이 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미할 수 있다. 상기 동물은 인간뿐만 아니라 이와 유사한 증상의 치료를 필요로 하는 소, 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개, 고양이 등의 포유동물일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명에 있어서, 개체는 암의 예방 및/또는 치료를 필요로 할 수 있다.

[129] 본 발명의 약학 조성물은 면역항암제와 CXCL12 억제제 및 CSF1 억제제를 포함하고, 상술한 암, 바람직하게는 면역항암제 저항성을 갖는 것을 특징으로 하는 암, 더욱 바람직하게는 p16^{INK4A}를 과발현하는 암에 현저히 향상된 예방 및 치료효과를 나타낸다.

[130] 본 발명에 따른 약학 조성물은 상기 유전자 또는 상기 단백질의 발현 또는 활성을 억제할 수 있는 안티센스 뉴클레오타이드, siRNA, shRNA, 화합물, 천연물, 추출물 등을 유효성분으로 포함할 수 있다.

[131] 본 발명의 약학 조성물은 단일제제로도 사용할 수 있고, 암의 예방 및/또는 치료 효과를 가진다고 알려진 약물을 추가로 포함하여 복합제제로 제조하여 사용할 수 있으며, 제제가 아닌 다른 항암치료와 병용하여 사용될 수 있다. 본 발명에 있어서, 병용가능한 면역항암제에는 예를 들어, 펌브로리주맵(Pembrolizumab), 니볼루맵(Nivolumab), 아테졸리주맵(Atezolizumab), 아벨루맵(Avelumab), 두발루맵(Durvalumab), CAR T와 같은 T세포 기반의 면역세포치료제 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[132] 본 발명의 약학 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다.

[133] 본 발명에서 사용되는 용어, "약제학적으로 허용 가능한 담체"란 생물체를

자극하지 않으면서, 주입되는 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 의미할 수 있다. 본 발명에 사용 가능한 상기 담체의 종류는 특별히 제한되지 아니하며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되고 약학적으로 허용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다. 상기 담체의 비제한적인 예로는, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사 용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다. 상기 담체는 비자연적 담체(non-naturally occurring carrier)를 포함할 수 있다. 또한, 필요한 경우 항산화제, 완충액 및/또는 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가하여 사용할 수 있으며, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제, 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제 등으로 제제화하여 사용할 수 있다.

- [134] 상기 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.
- [135] 본 발명에 따른 약학 조성물은 통상의 방법에 따라 다양한 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 적합한 제형으로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 당의정, 경질 또는 연질의 캡슐제, 용액제, 현탁제 또는 유화액제, 주사제, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [136] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약학적으로 불활성인 유기 또는 무기 담체를 이용하여 적합한 제형으로 제조할 수 있다. 즉, 제형이 정제, 코팅된 정제, 당의정 및 경질 캡슐제인 경우 락토스, 수크로스, 전분 또는 그 유도체, 탈크, 칼슘 카보네이트, 젤라틴, 스테아르산 또는 그 염을 포함할 수 있다. 또한, 제형이 연질 캡슐제인 경우에는 식물성 오일, 왁스, 지방, 반고체 및 액체의 폴리올을 포함할 수 있다. 또한, 제형이 용액 또는 시럽 형태인 경우, 물, 폴리올, 글리세롤, 및 식물성 오일 등을 포함할 수 있다.
- [137] 본 발명에 따른 약학 조성물은 상기의 담체 외에도 보존제, 안정화제, 습윤제, 유화제, 용해제, 감미제, 착색제, 삼투압 조절제, 산화방지제 등을 더 포함할 수 있다.
- [138] 발명에 따른 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다. 본 발명에 있어서, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 본 발명의 목적상, 특정 환자에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적인 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 구체적인 조성물과 함께 사용되거나 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의약 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다.
- [139] 본 발명의 약학 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여

투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양 및 간격으로 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

- [140] 본 발명의 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 약학 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다. 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여 방식은 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방식에 따를 수 있다. 투여의 방식은, 예를 들어, 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여될 수 있으며, 상기 예에 제한되는 것은 아니다.
- [141] 본 발명의 약학 조성물은 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별 및 체중 및 질환의 중등도 등의 여러 관련 인자와 함께, 활성성분인 약물의 종류에 따라 결정된다.
- [142] 본 발명의 조성물의 투여빈도는 특별히 이에 제한되지 않으나, 1일 1회 투여하거나 또는 용량을 분할하여 수회 투여할 수 있다.
- [143] 본 발명에 있어서, 분리된 생물학적 시료는 상기 의심 환자의 시료와 마찬가지로, 상기 유전자 또는 상기 단백질의 발현 또는 활성 수준에 있어서 정상 대조군과 차이가 나는 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장 또는 타액 등을 포함할 수 있고, 바람직하게는 대장암 조직이나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [144]
- [145] 본 발명의 암의 예방 및/또는 치료방법에서, CXCL12 억제제, CSF1 억제제 및 면역항암제는 각각 약학적 유효량으로 병용 투여될 수 있다. 상기 방법은 투여하는 단계 이전에 암의 예방 및/또는 치료를 필요로 하는 환자를 확인하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [146] 본 발명에 있어서, 상기 병용 투여하는 단계는 CXCL12 억제제, CSF1 억제제 및 면역항암제를 혼합한 혼합제를 투여함으로써 수행될 수 있다. 본 발명에 있어서, 상기 병용 투여하는 단계는 유효 성분으로 CXCL12 억제제, CSF1 억제제 및 면역항암제 중 어느 하나 또는 둘을 투여하는 제1 단계; 및 제1 단계에서 투여되지 않은 나머지를 포함하는 제2 단계를 동시에 또는 순차적으로 수행하는 것일 수 있다. 순차적으로 투여하는 경우 그 순서는 서로 바뀌어도 무방하다.
- [147] 본 발명에 있어서, CXCL12 억제제, CSF1 억제제 및 면역항암제가 순차적으로 투여되는 경우, 투여 간격은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간 등을 고려하여 가장 적합한 투여량과 투여간격으로 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[148]

[149] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시 예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시 예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[150]

[151] [실시예]

[152] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[153]

[154] 대장암 샘플

[155] CRC(Colorectal cancer) 샘플은 아주대학교 병원에서 사전 동의를 얻은 환자로부터 외과적 절제 수술 후 획득했다. SA- β -Gal 염색을 위한 신선한 종양 및 정상 조직은 절개 직후 숙련된 병리학자에 의해 대표영역으로부터(representative area) 별도로 샘플링되어, 2개의 동일한 조직 단편으로 분할하였다. 아주대학교 병원의 조직 표본 규정에 따라, 하나는 액체 질소로 즉시 냉동하고, 다른 하나는 FFPE 처리하였다. 수술 전에 화학 요법 또는 방사선 요법 경험이 있는 환자는 연구에서 제외되었다.

[156]

[157] 암 세포주

[158] SW480 세포는 한국 세포주 은행(KCLB, 서울, 한국)에서 구매했다. SW480 세포는 10% FBS를 함유하는 완전 RPMI 배지에서 유지하였으며, MC38 세포는 Kerafast (매사추세츠 주, 미국)에서 구매했으며 10% FBS를 함유하는 완전 DMEM 배지에서 유지하였다.

[159]

[160] 동물(마우스) 실험

[161] MC38-대조군 세포(1×10^6), MC38-mouse CXCL12 세포 (MC38-mCXCL12, 1×10^6), MC38-mouse CSF1 세포(MC38-mCSF1, 1×10^6), MC38-mouse shCSF1 세포 (MC38-shmCSF1, 1×10^6), CT26-대조군 세포(1×10^6) or CT26-mouse CXCL12 세포(1×10^6)를 100 μ L의 PBS에 재현탁하고, 각각 암컷 또는 수컷, C57BL/6 또는 BALB/c 마우스에 피하이식하고(7주령), 3주 후에 마우스를 희생시켰다. 면역관문억제제 치료실험의 경우, 종양 세포 (2×10^6)를 이식한 후, 일주일 뒤, 정상 이소타입 면역글로불린 G(mouse IgG2a; clone C1.18.4, rat IgG2a; clone 2A3, rat IgG1k; clone HRPN, BioXcell, West Lebanon, NH) 또는 항 PD-1 항체(10 mg/kg, BioXcell, clone RMP1-14)를 2주에 걸쳐 주에 2회씩 복강 내 주사하였다. 복강내 종양 이식 마우스(4 마리; MC38/IgG, 1 마리; MC38/PD1 Ab, 3 마리;

MC38-mCXCL12/IgG, MC38-mCXCL12/PD1 Ab)는 제외되었다. CXCL12 및 CSF1 억제제 치료실험의 경우, 동물 모델 체계를 일부 수정하였다 (Sanchez-Paulete et al., 2016; Woo et al., 2012). MC38-mCXCL12 세포(2×10^6)을 100 μ L의 PBS에 재현탁하고, 암컷 C57BL/6 마우스에 피하 이식하였다(7주령). 일주일 뒤, 정상 이소타입 면역글로불린 G(대조군-IgG) 또는 항 PD-1 항체를 단독 또는 항-CXCL12 (500 μ g/kg, Merck, Darmstadt, Germany, clone K15C) 또는 항 CSF1 (15 mg/kg, BioXcell, clone 5A1) 중성화 항체(neutralizing antibody)와 함께 2주에 걸쳐 주 2회 복강 내 주사하였다.

[162] 종양의 부피는 캘리퍼 측정 값으로, 다음의 공식을 사용하여 계산하였다:

[163] $V = (\text{너비}^2 \times \text{길이}) / 2$

[164]

[165] 면역조직화학염색 및 면역세포화학염색 (Immunohistochemistry and immunocytochemistry)

[166] 면역조직화학염색은 포르말린 고정된 파라핀-포매된 조직의 4 μ m 두께의 대표 조직 단편에서, Benchmark XT 자동화 프로세서(Ventana Medical Systems Inc, Tucson, AZ)에 의해 수행되었다. 검출은 Ventana Optiview DAB 키트(Ventana Medical Systems)를 사용하여 수행하였다. 이중면역조직화학분석은 Benchmark XT 자동화 면역조직화학 염색기(Benchmark XT automated immunohistochemistry stainer)에서 첫 번째 항체에 대해 UltraView universal DAB 검출 키트(#760-500, Ventana Medical Systems Inc) 및 두 번째 항체에 대해 UltraView Universal Alkaline Phosphatase Red 검출 키트 (#760-501, Ventana Medical Systems Inc)로 수행되었다.

[167]

[168] 면역세포화학 염색은 슬라이드를 pbs로 2회 세척하고 적절히 컨쥬게이트된 이차 항체와 함께 1시간 동안 배양하여 수행하였다. F-actin 염색의 경우, 슬라이드에 로다민 팔로딘(hodamine phalloidin)을 1시간동안 적용시킨 뒤, 형광현미경으로 분석하였다. 세포질 또는 핵이 중간 정도 또는 강한 정도의 염색 강도를 나타내면 양성으로 기록하였으며, 세포질 또는 핵 염색이 없거나 약한 경우에는 음성으로 기록되었다. p16^{INK4A}, CXCL12, 및 CSF1에 대한 면역염색은 면역양성 세포의 비율에 따라 등급을 매겼다(0: 1% 미만; 1+: 1~20%; 2+: 20~40%; 및 3+: 40% 초과).

[169]

[170] 세포 이동 분석

[171] 세포 이동은 Transwell® (5 μ m pore size, 24 well, Corning, NY)으로 평가하였다. 이동된 세포는 하부 챔버에서 현탁세포로 계수하였다.

[172]

[173] ELISA 분석

[174] 세포(3×10^5)를 24-웰 플레이트에 접종하고 48시간 동안 배양한 후, 배지를

수확하였다. 배양 배지 내로의 CXCL12 또는 CSF1의 분비는 제조사의 지시에 따라 CXCL12 (DSA00, R & D Systems) 또는 CSF1 ELISA 키트 (RayBiotech Life, Peachtree Corners, GA)를 사용하여 측정되었다.

[175]

[176] FACS 분석

[177] 단핵구는 마우스 항-인간 CD68-FITC (562117, 1:40, BD Biosciences, San Jose, CA) 및 마우스 항-인간 CD206-APC (550889, 1:40, BD Biosciences)와 함께 배양하였다. 실온의 암실에서 30분간 배양한 후, 5ml 폴리스티렌 원형바닥 튜브로 옮기고 유동 세포 분석(flow cytometry, BD FACSCanto II; BD Biosciences)을 실시하였다.

[178]

[179] 단핵구 분화

[180] 분리된 일차 단핵구를 대조군, ROS 처리, CXCL12 과발현 또는 CSF1 과발현 SW480 세포와 Transwell® (0.4 µm pore size, 6 well, Corning)를 사용하여 공동배양하거나, 대조군(SW480) 유래의 조절된 배지 또는 노화된 종양 세포(ROS 유도된 노화 SW480)와 함께 배양하였다. 6일동안 배양한 후, 상부 챔버를 제거하고 단핵구를 단일 세포로 분리하고 FACS 및 실시간 PCR분석을 수행하였다.

[181]

[182] 실시예 1: 대장암에서 p16^{INK4A} 발현 확인

[183] 대장암 환자의 대장암 샘플을 이용하여 p16^{INK4A} 발현을 면역조직화학염색을 통해 확인하였다. 면역화학염색법은 4µm 두께의 파라핀 처리된 조직 단편으로 수행되었다. 120개의 대장암 샘플을 대상으로 면역조직화학염색을 통해 분석한 p16^{INK4A}의 면역조직화학염색 결과를 토대로 염색된 세포의 비율에 따라 0: 1% 미만, 1+: 1~20%, 2+: 20~40%, 및 3+: 40% 초과로 분류하였다(도 1A).

[184] 도 1에 도시된 바와 같이, 대장암의 경우에는 p16^{INK4A} 발현이 높은 대장암이 약 85% 이상을 차지하는 것을 확인하였다.

[185]

[186] 실시예 2: p16^{INK4A} 과발현 대장암에서의 CXCL12 및 CSF1 발현 확인

[187] 다음으로, p16^{INK4A} 과발현 대장암에서의 CXCL12 및 CSF1 발현을 면역화학염색법으로 확인하였다. 실시예 1과 같이, 면역화학염색법은 4µm 두께의 파라핀 처리된 조직 단편으로 수행되었으며, 일차 항체(Primary antibody)로 표 1의 항체를 사용하였다.

[188]

[189] 도 2A에 도시된 바와 같이, 대장암 조직의 p16^{INK4A} 발현 음성(검정색 점선) 또는 양성(노란색 점선) 부위와 CXCL12 발현 음성(검정색 점선) 또는 양성(노란색 점선) 부위가 일치함을 확인할 수 있으며, 이는 p16^{INK4A} 발현 대장암세포에서 CXCL12의 발현이 증가하였음을 의미한다.

- [190] 도 2B에 도시된 바와 같이, 대장암 조직의 p16^{INK4A} 발현 음성(빨간색 점선) 또는 양성(노란색 점선) 부위와 CSF1 발현 음성(빨간색 점선) 또는 양성(노란색 점선) 부위가 일치함을 확인할 수 있으며, 이는 p16^{INK4A} 발현 대장암세포에서 CSF1의 발현이 증가하였음을 의미한다.
- [191] 도 2C에 도시된 바와 같이, 대장암 샘플에서 p16^{INK4A} 발현 정도가 증가할수록(가로축), CSF1의 발현 정도 또한 증가하는 것을 확인하였다.
- [192]
- [193] 실시예 3: p16^{INK4A} 과발현 대장암의 면역항암제 저항성 획득 메커니즘 확인
- [194] 실시예 3-1: CXCL12에 의한 대장암의 면역 회피
- [195] 상기 동물(마우스) 실험에 기재된 것과 동일한 방법으로 대조군 종양세포(MC38-control) 및 CXCL12 과발현 종양세포(MC38-mCXCL12)를 10마리의 쥐에게 피하이식하고(7주령), 종양 크기의 변화를 확인하고, 이어서, 분리된 종양에서의 CD8 T 세포의 침윤을 분석하였다.
- [196] 도 3A 및 3B에 도시된 바와 같이, CXCL12 과발현 종양세포를 이식한 마우스의 경우에 종양크기의 증가 속도가 훨씬 큰 것으로 나타났다.
- [197] 도 3C는 대조군 및 CXCL12 과발현 세포주를 체외 세포 배양접시에서 배양한 경우의 두 세포군의 성장 속도를 나타낸다. 양 세포주의 성장속도가 동일하게 나타났으며 이는, 마우스 피하에 세포주 주입후 발생한 종양의 크기가 다른 것이 각각의 세포주의 자체 분열 속도에 의한 것이 아니며, 종양주변환경의 CD8 T 세포의 침윤 정도에 의한 것임을 의미한다.
- [198] 도 3D에 도시된 바와 같이, CXCL12를 분비하는 종양에서 T cells의 침윤이 현저히 감소하는 것을 확인할 수 있다.
- [199]
- [200] 나아가, 면역화학염색 분석을 통해, CXCL12 항체, CSF1 항체 및 PD-1 항체를 단독 또는 조합하여 병용 투여하였을 때, CXCL12 과발현 종양세포(MC38-mCXCL12)에서 CD8 T 세포의 종양 내 침윤을 확인하였다.
- [201] 도 4에 도시된 바와 같이, CSF1 항체 및 PD-1 항체를 단독 투여한 결과는 대조군(IgG에 비하여) 종양 내 CD8 T 세포 침윤의 유의미한 증가를 나타내지 못하였으며, CXCL12 항체 단독 투여, CXCL12/PD-1 항체 병용투여, CXCL12/CSF1/PD-1 항체 병용투여한 경우에 CD8 T 세포 침윤의 유의미한 증가를 나타냈고, 특히, CXCL12/CSF1/PD-1를 병용 투여한 경우에 가장 뛰어난 CD8 T 세포 침윤 증가를 나타내었다.
- [202]
- [203] 실시예 3-2: CSF1에 의한 대장암의 면역 회피
- [204] CSF1에 의한 대장암의 면역항암제 저항성 획득 메커니즘을 확인하기 위해, 분리된 일차 단핵구를 대조군, ROS 처리, CXCL12 과발현, CSF1 과발현 또는 CXCL12/CSF1 과발현 SW480 세포와 Transwell® (0.4 µm pore size, 6 well, Corning)를 사용하여 공동배양하거나, 대조군(SW480) 유래의 조절된 배지 또는

노화된 종양 세포(ROS 유도된 노화 SW480)와 함께 배양하였다. 6일동안 배양한 후, 상부 챔버를 제거하고 단핵구를 단일 세포로 분리하고 FACS 및 실시간 PCR분석을 수행하였다.

[205]

[206] 도 5에 도시된 바와 같이, 대조군에 비해 CXCL12 과발현, CSF1 과발현 또는 CXCL12/CSF1 공동 과발현 SW480 세포가 단핵구의 M2형 대식세포(CD68+CD206+)로의 분화를 촉진하는 것을 확인하였다. 특히, CXCL12/CSF1 공동 과발현 SW480 세포의 경우에는 ROS를 직접 처리한 것과 동일한 수준의 대식세포 분화 유도 능력을 나타내었다.

[207]

[208] M2형 대식세포(CD68+CD206+)는 종양 촉진성 대식세포로서, 세포독성 T세포의 활성을 감소시켜 종양의 성장을 촉진하는 것으로 알려져 있으므로, 추가적으로 대조군 종양세포(MC38), CSF1 과발현 종양세포(MC38-CSF1) 및 CSF1 억제 종양세포(MC38-CSF1)를 마우스에 피하이식하고, 종양의 성장을 관찰하였다.

[209]

도 6A에 도시된 바와 같이, CSF1 과발현 종양세포(MC38-CSF1)의 경우, 대조군에 비해 종양의 성장이 증가한 반면, CSF1 억제 종양세포(MC38-shCSF1)의 경우에는 대조군에 비해 종양의 성장이 감소하였다.

[210]

추가적으로, 도 6B에 도시된 바와 같이, 면역화학염색 분석을 통해 M2형 대식세포(CD206+)의 수가 증가하고, CD8 T cells의 활성도를 나타내는 granzyme B (GZMB) 양성 T 세포 수가 적어지는 것을 확인하였다. 반면, CSF1 억제 종양세포(MC38-shCSF1)의 경우, M2형 대식세포(CD206+)의 수가 감소하고, CD8 T cells의 활성도를 나타내는 granzyme B (GZMB) 양성 T 세포 수가 많아지는 것을 확인하였다.

[211]

[212] 실시예 3-1 및 3-2의 결과를 종합하여, p16^{INK4A} 과발현 대장암에서 CXCL12 및 CSF1의 발현이 현저히 증가하며, CXCL12 발현의 증가는 종양 내의 CD8 cytotoxic T cell의 침윤을 억제하고, CSF1의 증가는 단핵구의 M2형 대식세포로의 분화에 관여하여, cytotoxic T cell의 활성을 감소시킴으로써, 두 가지 매커니즘의 시너지 효과로 인해, T 세포 관련 면역에 대한 저항성을 획득한 것을 확인하였다.

[213]

상기 결과는, p16^{INK4A} 과발현 암의 T세포 효능의 증진과 관련된 면역항암제 저항성 획득 매커니즘을 증명하는 것이다.

[214]

[215] 실시예 4: 면역항암제 저항성 세포주에 대한 CXCL12 억제제, CSF1 억제제, 및 면역항암제 병용 투여 효과 확인

[216]

실시예 3에서 규명한, p16^{INK4A} 과발현 대장암의 T세포 효능의 증진과 관련된 면역항암제 저항성 획득 매커니즘을 바탕으로, CXCL12 억제제, CSF1 억제제, 및 면역항암제의 병용 투여 효과를 동물 실험을 통해 확인하였다.

[217] 암컷 C57BL/6 마우스에 피하 이식하였다(7주령). 일주일 뒤, 정상 이소타입 면역글로불린 G(대조군-IgG) 또는 항 PD-1 항체를 단독 또는 항-CXCL12 (500 µg/kg, Merck, Darmstadt, Germany, clone K15C) 또는 항 CSF1 (15 mg/kg, BioXcell, clone 5A1) 중성화 항체(neutralizing antibody)와 함께 2주에 걸쳐 주 2회 복강 내 주사하고, 3 주째에, 종양세포를 분리하여 종양 크기의 감소효과를 확인하였다(도 7A).

[218]

[219] 도 7 및 도 8에 도시된 바와 같이, 대조군과 비교하여, PD-1 항체, CXCL12 항체 및 CSF1 항체를 단독으로 투여한 경우 각각 평균 20.4%, 26.7% 및 37.0%의 종양 크기 감소를 나타냈으며, PD-1 항체와 CXCL12 항체의 병용투여는 48.9%로 종양 크기 감소능이 다소 증가하였음을 나타내었다. PD-1 항체와 CXCL12 항체 및 CSF1 항체의 병용투여는 평균 76.1%의 종양 크기 감소율을 나타내, 단일 투여보다 2배 내지 3배, CXCL12 및 PD-1 항체 병용투여보다 1.5배 이상의 종양 크기 감소율 증가를 나타냈다.

[220]

[221] 본 실시예를 통해 확인한 것과 같이, PD-1 항체와 CXCL12 항체 및 CSF1 항체의 병용 투여가 면역항암제 저항성을 갖는 암을 상대로 현저히 향상된 종양 크기 감소 및 치료효과를 나타내는 것을 확인하였다. 본 발명의 약학 조성물, 병용요법 및 암의 치료방법은 암의 치료, 특히 면역관문억제제로 대표되는 면역항암제 저항성 암의 치료에 있어서 매우 뛰어난 효과를 가진다.

[222]

[223] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 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.

[224]

산업상 이용가능성

[225] 본 발명에 따른 SP-HAMP 기술은 기존의 LAMP 기술에서 요구되는 복잡한 디자인의 별도의 프라이머가 필요하지 않아, 간편하며, 기존의 LAMP 반응보다 향상된 검출 효율을 가지며, 표적핵산으로 DNA뿐만 아니라 RNA 검출도 가능하여, 보다 넓은 분야에 적용이 가능하다.

[226]

[227] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 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.

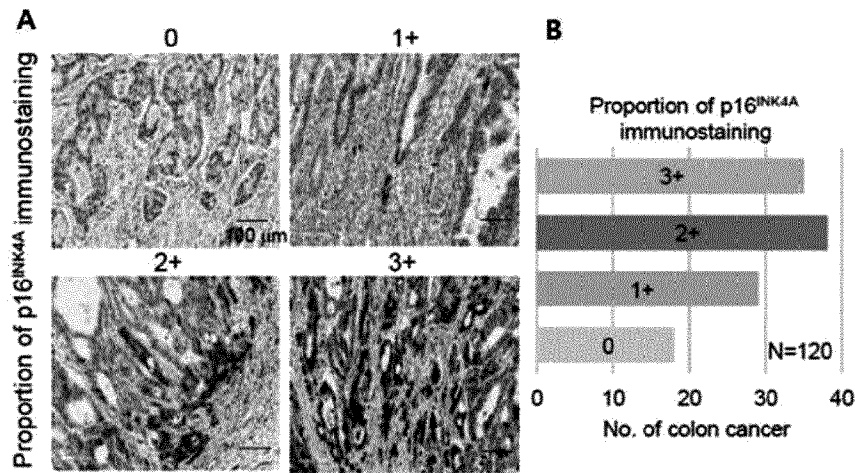
청구범위

- [청구항 1] CXCL12(C-X-C motif chemokine 12) 억제제, CSF1(colony stimulating factor 1) 억제제, 및 면역항암제를 포함하는 암의 예방 및/또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 CXCL12 억제제는 CXCL12 유전자 발현 억제제, 또는 CXCL12 단백질 활성 억제제인 것을 특징으로 하는 암의 예방 및/또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 유전자 발현 억제제는 CXCL12 유전자를 표적으로 하는 안티센스 뉴클레오타이드(antisense nucleotide), siRNA(small interfering RNA), shRNA(small hairpin RNA), 리보자임(ribozyme), 압타머(aptamer), anti-microRNA, MicroRNA mimic, nuclease, Zinc Finger Nucleases(ZFNs), Transcription activator-like effector nucleases (TALENs), gRNA, sgRNA 및 self-ribozyme-flanked RNA로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 암의 예방 및/또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 4] 제2항에 있어서, 상기 단백질 활성 억제제는 CXCL12 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 모방체, 기질 유사체, 압타머, 항체 및 이의 단편으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 암의 예방 및/또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 CSF1 억제제는 CSF1 유전자 발현 억제제 또는 CSF1 단백질 활성 억제제인 것을 특징으로 하는 암의 예방 및/또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 유전자 발현 억제제는 CSF1 유전자를 표적으로 하는 안티센스 뉴클레오타이드(antisense nucleotide), siRNA(small interfering RNA), shRNA(small hairpin RNA), 리보자임(ribozyme), 압타머(aptamer), anti-microRNA, MicroRNA mimic, nuclease, Zinc Finger Nucleases(ZFNs), Transcription activator-like effector nucleases (TALENs), gRNA, sgRNA 및 self-ribozyme-flanked RNA로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 암의 예방 및/또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 7] 제5항에 있어서, 상기 단백질 활성 억제제는 CSF1 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 모방체, 기질 유사체, 압타머, 항체 및 이의 단편으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 암의 예방 및/또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 면역항암제는 면역관문억제제(immune checkpoint inhibitor) 또는 면역세포치료제(immune cell therapy)인 것을 특징으로 하는 암의 예방 및/또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 면역관문억제제(immune checkpoint inhibitor)는 T세포 면역관문억제제인 것을 특징으로 하는 암의 예방 및/또는 치료용

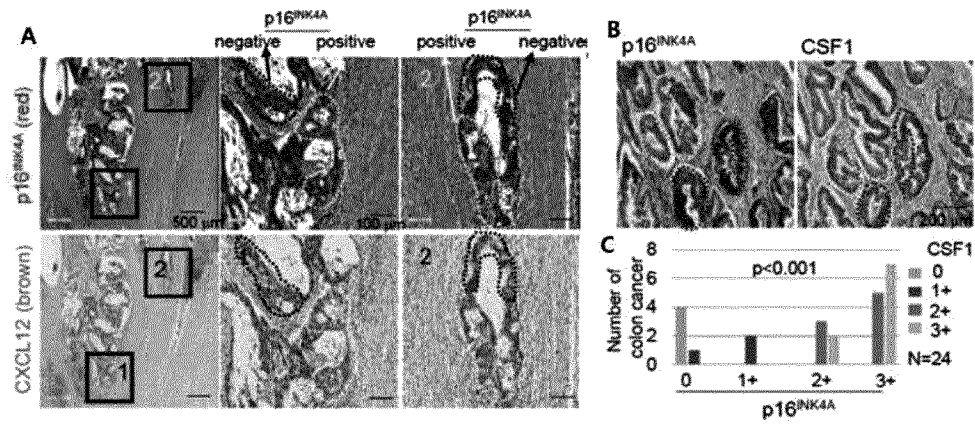
약학 조성물.

- [청구항 10] 제8항에 있어서, 상기 면역관문억제제(immune checkpoint inhibitor)는 A2AR, B7-H3(CD276) 또는 B7-H3 수용체, B7-H4(VTCN1) 또는 B7-H4 수용체, BTLA(CD272), CTLA-4(CD152), IDO, KIR, LAG3, NOX2, PD-1, PD-L1, PD-L2, TIM3, VISTA 및 SIGLEC7으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 면역관문을 표적으로 하는 것을 특징으로 하는 암의 예방 및/또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 11] 제8항에 있어서, 상기 면역관문억제제는 PD-1 또는 PD-L1을 표적으로 하는 것을 특징으로 하는 암의 예방 및/또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 12] 제8항에 있어서, 상기 면역세포 치료제는 T 세포 기반 면역 치료제인 것을 특징으로 하는 암의 예방 및/또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 13] 제1항에 있어서, 상기 암은 면역항암제 저항성을 갖는 것을 특징으로 하는 암의 예방 및/또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 14] 제13항에 있어서, 상기 암은 p16^{INK4A}의 발현이 정상세포에 비해 증가된 것을 특징으로 하는 암의 예방 및/또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 15] CXCL12 억제제, CSF1 억제제 및 면역항암제의 암의 예방 및/또는 치료를 위한 병용 투여용 약학 조성물의 제조를 위한 용도.
- [청구항 16] CXCL12(C-X-C motif chemokine 12) 억제제 및 CSF1(colony stimulating factor 1) 억제제의 암의 예방 및/또는 치료를 위한 면역항암제와의 병용 투여용도.
- [청구항 17] CXCL12 억제제, CSF1 억제제 및 면역항암제를 개체에 병용 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 및/또는 치료방법.
- [청구항 18] 제17항에 있어서, 상기 암은 p16^{INK4A}, CXCL12 및 CSF1으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 유전자 또는 이의 단백질의 발현 또는 활성 수준이 향상된 것을 특징으로 하는 암의 예방 및/또는 치료방법.
- [청구항 19] (a) 개체에서 분리된 생물학적 시료에서, p16^{INK4A}, CXCL12 및 CSF1으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 유전자 또는 이의 단백질의 발현 또는 활성 수준을 측정하는 단계;
 (b) 상기 유전자 또는 이의 단백질의 발현 또는 활성 수준을 정상 대조군 시료의 해당 유전자 또는 이의 단백질의 발현 또는 활성 수준과 비교하여 개체의 면역항암제 저항성을 예측하는 단계; 및
 (c) 상기 유전자 또는 이의 단백질의 발현 또는 활성 수준이 증가한 경우, CXCL12 억제제, CSF1 억제제 및 면역항암제를 병용 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 및/또는 치료방법.

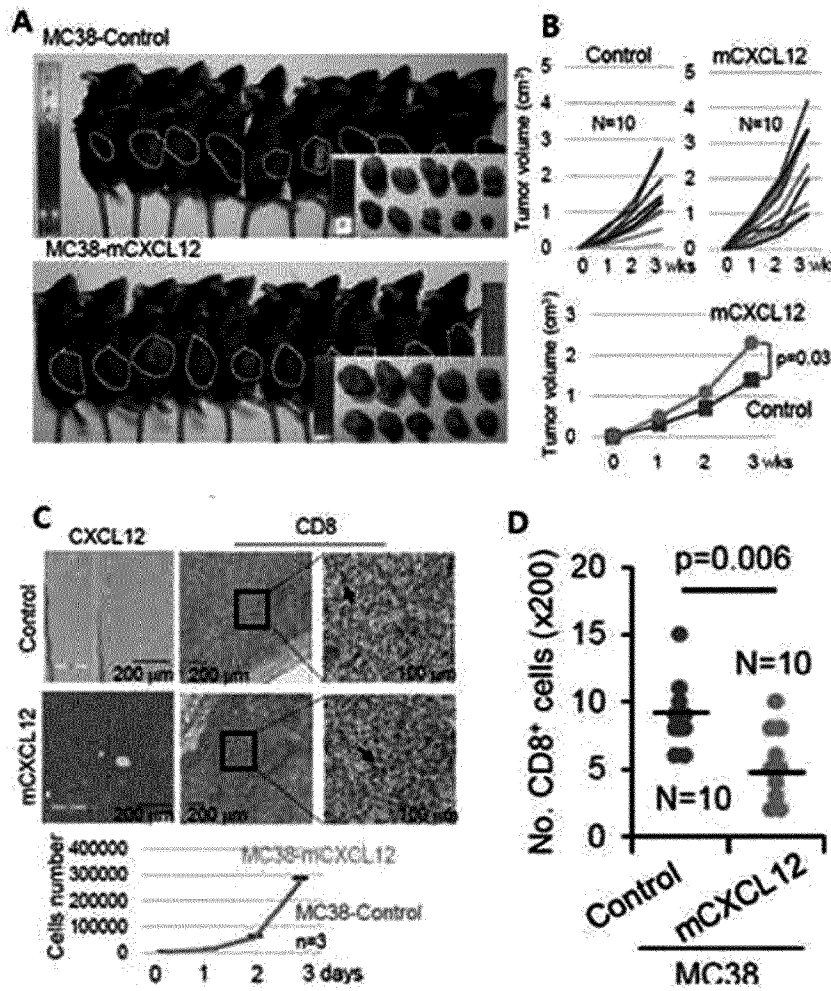
[도1]



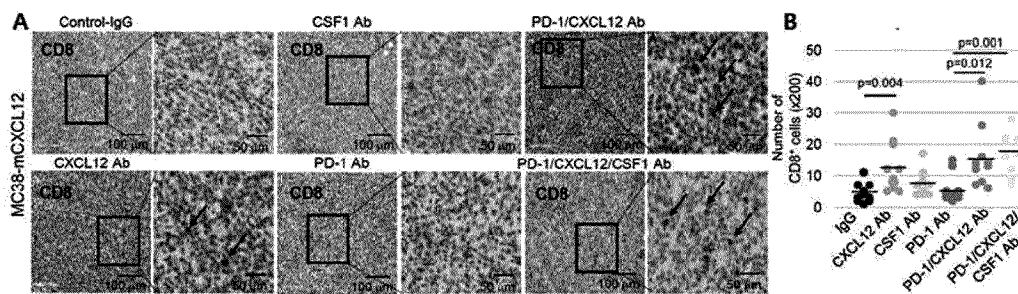
[도2]



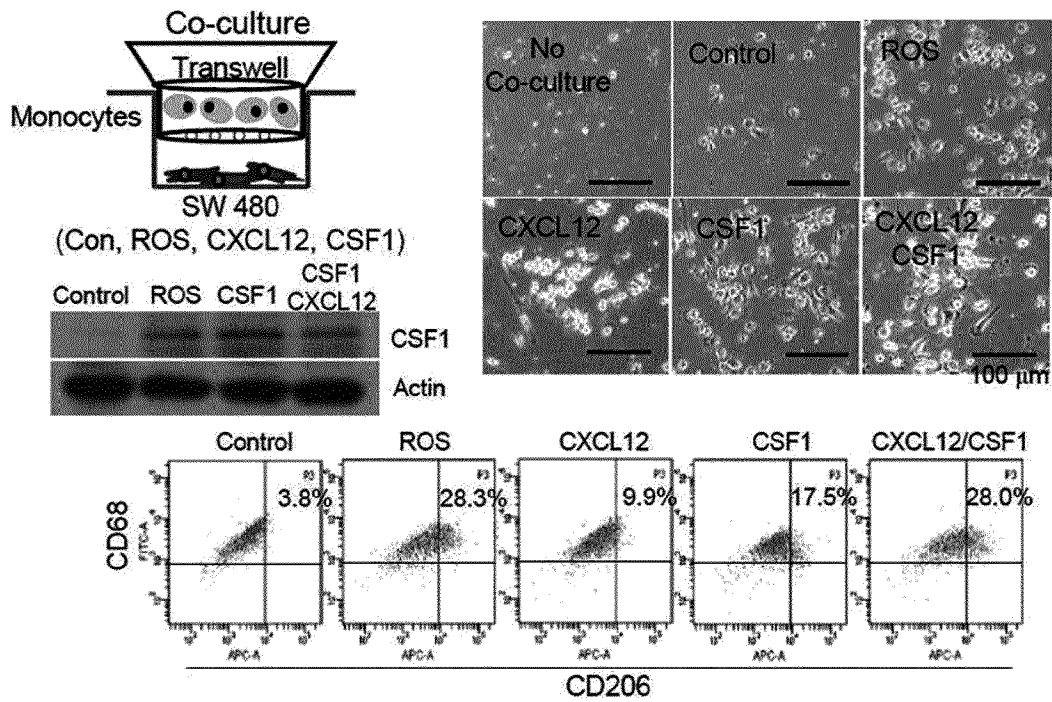
[도3]



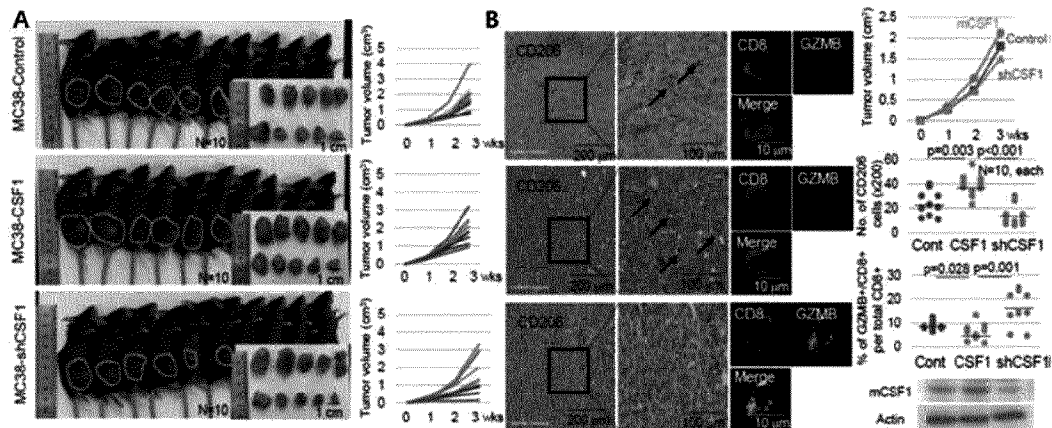
[도4]



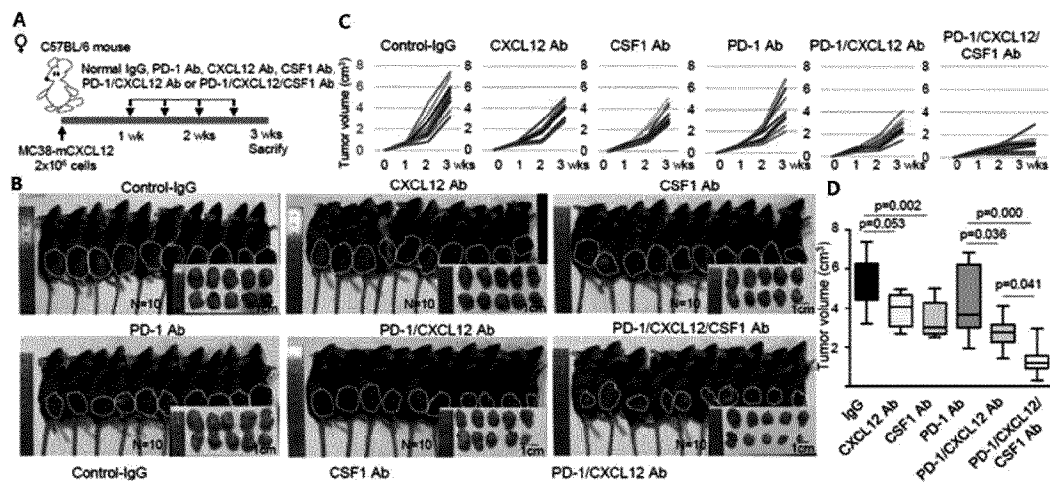
[도5]



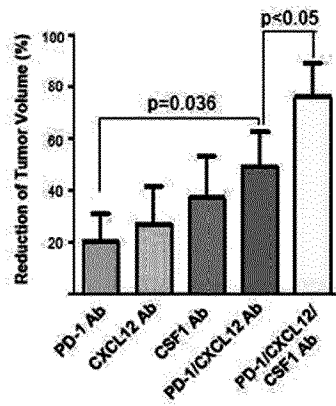
[도6]



[도7]



[도8]



Reduction of Tumor Volume (%) +/- SD vs IgG	
PD-1 Ab	20.4 +/- 32.6
CXCL12 Ab	26.7 +/- 15.0
CSF1 Ab	37.0 +/- 16.3
PD-1/CXCL12 Ab	48.9 +/- 13.5
PD-1/CXCL12/CSF1 Ab	76.1 +/- 13.3