



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0167741
(43) 공개일자 2023년12월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 35/15 (2015.01) A61K 45/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01) G01N 33/50 (2017.01)

(52) CPC특허분류

A61K 35/15 (2023.05)

A61K 45/06 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0070870

(22) 출원일자 2023년06월01일

심사청구일자 2023년06월01일

(30) 우선권주장

1020220067313 2022년06월02일 대한민국(KR)

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

이경미

서울특별시 강남구 압구정로 151, 105동 505호 (압구정동, 현대아파트)

김정수

서울특별시 성북구 아리랑로4길 68, 302호 (동선동4가)

(74) 대리인

특허법인태백

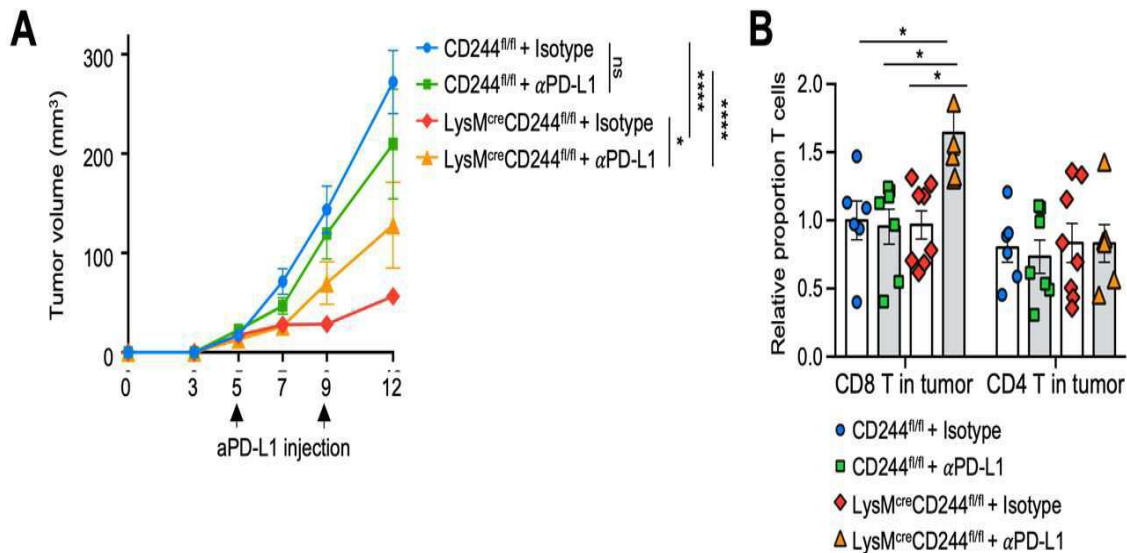
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 CD244 발현 또는 활성을 억제시킨 단핵구 또는 대식세포를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 CD244 발현 또는 활성을 억제시킨 단핵구 또는 대식세포를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, CD244가 단핵구에서 대식세포로의 분화를 억제하고, CD244 발현 또는 활성을 억제시킨 단핵구 및 대식세포가 식세포 작용 및 항원 제시를 증가시켜 종양의 성장을 억제하고, T 세포의 항원 특이적 활성화를 유도하는 것을 확인함으로써, 암 예방 또는 치료용 조성물로서 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도7a



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

G01N 33/5055 (2013.01)

A61K 2300/00 (2023.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711188389
과제번호	2020R1A2C2103061
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	CD244에 의한 건선질환 제어 기전 연구
기 여 율	50/100
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711195967
과제번호	00225581
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	혁신신약 기초기반기술개발(R&D)
연구과제명	종양 내 대식세포 조절인자 CD244의 역할 규명 및 치료제 기술 확립
기 여 율	50/100
과제수행기관명	고려대학교산학협력단
연구기간	2023.04.01 ~ 2023.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

CD244 발현 또는 활성을 억제시킨 단핵구(monocyte) 또는 대식세포(macrophage)를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 약학 조성물은 식세포 작용 또는 항원 제시를 증가시켜 암의 성장을 억제하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 약학 조성물은 T 세포의 항원 특이적 활성화를 유도하여 IFN- γ 의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 단핵구는 CD11b+, CD14+, CD16-, Ly6G- 및 Ly6Chi로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 마커를 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 대식세포는 CD11b+, CD14+, CD16+, CD68+, Ly6G-, Ly6C^{lo} 및 F4/80+로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 마커를 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 암은 위암, 결장암, 유방암, 폐암, 비소세포성폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부암, 두경부암, 흑색종, 자궁암, 난소암, 대장암, 소장암, 직장암, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암, 자궁경부암, 질암, 음문암, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 임파선암, 방광암, 담낭암, 내분비선암, 전립선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 신장암, 수뇨관암, 신장골반암, 혈액암, 뇌암, 중추신경계(CNS; central nervous system) 종양, 척수 종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 7

CD244 발현 또는 활성을 억제시킨 단핵구(monocyte) 또는 대식세포(macrophage); 및 항암제를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 병용 투여 약학 조성물.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 항암제는 세포독성항암제, 표적항암제 및 면역항암제로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 항암제인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 세포독성항암제는 독소루비신(doxorubicin), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 테모졸로마이드(temozolomide), 이리노테칸(irinotecan), 시스플라틴(cisplatin), 빈블라스틴(vinblastine), 빈크리스틴(vincristine), 액티노마이신-D(actinomycin-D), 5-플로오우라실(5-fluouracil), 도세탁셀(docetaxel), 카바지탁셀(cabazitaxel), 파클리탁셀(paclitaxel) 및 펌브롤리주맵(pembrolizumab)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 10

청구항 8에 있어서, 상기 표적항암제는 트라메티닙(Trametinib), 베무라페닙(vemurafenib), 알펠리십(alpelisib), 닥톨리십(dactolisib), 게피티닙(Gefitinib), 엘로티닙(Erlotinib), 라파티닙(Lapatinib), 수니티닙(Sunitinib), 소라페닙(Sorafenib), 크리조티닙(Crizotinib), 다브라페닙(Dabrafenib), 트라스투주맙(Trastuzumab), 세특시맙(Cetuximab), 베바시주맙(Bevacizumab), 파니투무맙(Panitumumab), 이필리무맙(Ipilimumab), 퍼투주맙(Pertuzumab), 토파시티닙(Tofacitinib), 이마티닙(Imatinib), 보르테조밍(Bortezomib), 오파투무맙(Ofatumumab) 및 알렘투주맙(Alemtuzumab)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 11

청구항 8에 있어서, 상기 면역항암제는 항-PD-1, 항-PD-L1, 항-CTLA-4, 항-LAG-3, 항-TIGIT, 항-TIM-3, 항-GITR, CAR-T 및 NK cell로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 12

CD244 발현 또는 활성을 억제시킨 단핵구(monocyte) 또는 대식세포(macrophage)를 유효성분으로 포함하는 항암제 효능 증진용 조성물.

청구항 13

CD244 발현 또는 활성을 억제시킨 단핵구(monocyte) 또는 대식세포(macrophage)를 인간을 포함하는 개체에 단독 투여하거나 항암제와 병용 투여하는 단계를 포함하는 암 예방 또는 치료 방법.

청구항 14

CD244 억제제 또는 CD244의 리간드인 CD48 억제제를 유효성분으로 포함하는 단핵구(monocyte)에서 대식세포(macrophage)로의 분화 유도용 조성물.

청구항 15

청구항 14에 있어서, 상기 CD244 억제제 또는 CD48 억제제는 CD244 또는 CD48 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 앵타머, 항체 및 천연물로 이루어지는 군에서 선택되거나, CD244 또는 CD48 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 작은 간섭 RNA(small interfering RNA; siRNA), 안티센스 뉴클레오타이드 및 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA; shRNA)로 이루어지는 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 단핵구(monocyte)에서 대식세포(macrophage)로의 분화 유도용 조성물.

청구항 16

후보물질을 세포에 처리하여 CD244 또는 이의 리간드인 CD48의 발현 또는 활성 억제를 분석하는 단계를 포함하는, 단핵구(monocyte)에서 대식세포(macrophage)로의 분화유도제의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 CD244 발현 또는 활성을 억제시킨 단핵구 또는 대식세포를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 면역 탈진은 과도한 면역반응 또는 면역억제성 주변 환경에 의해 발생하며 항종양 면역반응과 염증성 사이토카인의 발현이 감소하여 면역억제성 종양미세환경을 형성하는 것으로 알려져 있다. 면역 탈진은 주로 T cell에서 발현하는 면역관문 수용체인 PD-1, CTLA-4, LAG-3, TIM-3 등에 의한 분자적 기전을 통해 발생한다. 최근에 PD-1, PD-L1 및 CTLA-4의 신호전달을 억제하는 항체 치료제들이 개발되어 항암치료에 사용되고 있다. 하지만, 이러한 치료제들은 고형암의 종양미세환경과 종양세포의 다형성, 종양침윤면역세포의 부족 등 다양한 요인에 의해서 제한된 유전형 및 종양미세환경을 충족시키는 소수의 환자들에게만 효과를 발휘하고 있는 실정이다.

[0003] CD244(SLAMF4, 2B4)는 signaling lymphocyte activation molecule family (SLAMF)에 속하는 면역세포 수용체이

다. CD244는 NK cell과 CD8 T cell에서 어떤 신호전달 분자가 결합하는지에 따라 면역 반응 활성화와 억제, 두 가지 기능을 수행할 수 있는 독특한 수용체이다. 최근에 수행되었던 연구들에서 종양미세환경에서 CD244가 NK cell과 CD8 T cell이 탈진된 상태를 유지하도록 억제하고 있다는 것이 밝혀졌다. CD244의 세포 내부 도메인은 4 개의 immunoreceptor tyrosine-based switch motif(ITSM)으로 구성되어 있으며 SAP, EAT-2, SHP1, SHP2, SHIP-1 등의 신호전달분자와 결합할 수 있다. CD244는 SAP와 결합하는 경우에 면역 활성화 신호를 전달하고 SH2 인산가수분해 효소들과 결합하는 경우에는 면역 억제 신호를 전달한다고 알려져 있다. CD244가 어떤 신호를 전달하는지에는 신호전달 분자들의 상대적인 발현량과 경쟁적 결합 등이 중요하게 작용한다.

[0004] 단핵구(monocyte)와 대식세포(macrophage)는 선천면역반응과 적응면역반응 사이를 연결하고 주변 환경을 감지하고 선천 및 적응면역반응을 결정하는 중요한 세포이다. 최근의 많은 연구들이 면역치료에 반응하지 않는 종양을 일컫는 “차가운 종양”을 형성하는 중요한 세포로 단핵구와 대식세포에 주목하고 있다. 진행성 간암 환자들의 면역세포에 대한 연구에서 종양 주변 조직에 단핵구와 단핵구에서 분화한 대식세포가 많이 침윤되어 있으며 이는 종양 내부의 NK cell의 수와 TNF- α , IFN- γ 등 면역 활성화 사이토카인들이 감소하는 현상과 연관되어 있다는 것이 밝혀졌다. 또한, 같은 연구에서 종양 침윤 단핵구에 높은 수준으로 발현하고 있는 CD48이 NK cell의 CD244와 결합하였을 때 NK cell이 심각하게 탈진되어 제 기능을 수행하지 못한다는 것을 보였다. CD244는 CD8 T cell과 NK cell뿐만 아니라 단핵구, 대식세포 등 다양한 골수성 면역세포에서도 발현되고 있지만 이러한 세포들에서 어떠한 역할을 수행하는지에 대해서는 밝혀지지 않았다.

[0005] 따라서 본 발명자는 앞선 연구들과는 반대로 단핵구-대식세포에서 발현하는 CD244가 주변 혈구세포들이 발현하는 CD48과의 상호작용을 통해 어떤 기능을 수행하는지 밝히고자 하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 미국 공개특허 US 2019-0054090(2019.02.21.공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 CD244 활성을 억제시킨 단핵구 또는 대식세포를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 CD244 발현 또는 활성을 억제시킨 단핵구 또는 대식세포를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 CD244 발현 또는 활성을 억제시킨 단핵구 또는 대식세포; 및 항암제를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 병용 투여 약학 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 CD244 발현 또는 활성을 억제시킨 단핵구 또는 대식세포를 유효성분으로 포함하는 항암제 효능 증진용 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 CD244 발현 또는 활성을 억제시킨 단핵구 또는 대식세포를 인간을 포함하는 개체에 단독 투여하거나 항암제와 병용 투여하는 단계를 포함하는 암 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 CD244 억제제를 유효성분으로 포함하는 단핵구에서 대식세포로의 분화 유도용 조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 후보물질을 세포에 처리하여 CD244 발현 또는 활성 억제를 분석하는 단계를 포함하는, 단핵구에서 대식세포로의 분화유도제의 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 따르면, CD244가 단핵구에서 대식세포로의 분화를 억제하고, CD244 발현 또는 활성을 억제시킨 단핵

구 및 대식세포가 식세포 작용 및 항원 제시를 증가시켜 종양의 성장을 억제하고, T 세포의 항원 특이적 활성화를 유도하는 것을 확인함으로써, 암 예방 또는 치료용 조성물로서 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015]

도 1은 종양 유도 시 단핵구에서 CD244 발현 변화와, 단핵구 특이적 CD244 결핍 마우스 모델을 이용하여 항암 효과를 분석한 결과이다.

도 2는 Flox 및 cKO 마우스 사이 종양 내 T 세포의 활성 및 종양 항원 특이성을 분석한 결과이다.

도 3는 Flox 및 cKO 마우스 사이 종양 내 단핵구-대식세포의 비율과 CD244 결핍 시 단핵구-대식세포 분화가 변화하는지 분석한 결과이다.

도 4는 CD244 결핍 마우스 모델을 이용하여 CD244가 M1 대식세포 분극화와 항원제시, 식세포 작용 등 기능에 영향을 미치는지 분석한 결과이다.

도 5는 단일세포 전사체 분석 데이터와 세포 실험을 통해 CD244의 발현이 단핵구에서 ER stress에 의해 유도되는지 분석한 결과이다.

도 6은 CD244가 autophagy를 통해 단핵구-대식세포의 분화를 조절하는지 분석한 결과이다.

도 7은 단핵구-대식세포 특이적으로 CD244를 제거하거나 CD244 결핍 대식세포를 투여하였을 때 면역관문 억제제의 효능이 증가하는지 분석한 결과이다.

도 8은 단일세포 전사체 분석 데이터를 통해 흑색종 환자에서 CD244 발현량이 높은 환자군과 낮은 환자군 사이 단핵구-대식세포, T 세포의 기능 및 생존율에 차이가 있는지 분석한 결과이다.

도 9는 단일세포 전사체 분석 데이터를 통해 대장암, 비소세포폐암, 교모세포종 환자에서 흑색종에서와 같이 CD244가 단핵구-대식세포를 조절하는지 분석한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016]

이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0017]

[0018]

본 발명은 CD244 발현 또는 활성을 억제시킨 단핵구(monocyte) 또는 대식세포(macrophage)를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0019]

상기 약학 조성물은 식세포 작용 또는 항원 제시를 증가시켜 암의 성장을 억제할 수 있다.

[0020]

또한, 상기 약학 조성물은 T 세포의 항원 특이적 활성화를 유도하여 IFN- γ 의 발현을 증가시킬 수 있다.

[0021]

상기 단핵구는 CD11b⁺, CD14⁺, CD16⁻, Ly6G⁻ 및 Ly6Chi로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 마커를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0022]

상기 대식세포는 CD11b⁺, CD14⁺, CD16⁺, CD68⁺, Ly6G⁻, Ly6Clo 및 F4/80⁺로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 마커를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0023]

상기 암은 위암, 결장암, 유방암, 폐암, 비소세포성폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부암, 두경부암, 흑색종, 자궁암, 난소암, 대장암, 소장암, 직장암, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암, 자궁경부암, 질암, 음문암, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 임파선암, 방광암, 담낭암, 내분비선암, 전립선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 신장암, 수뇨관암, 신장골반암, 혈액암, 뇌암, 중추신경계(CNS; central nervous system) 종양, 척수 종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0024]

본 발명의 약학 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다.

[0025]

상기 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리

비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸 히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘, 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약학 조성물은 상기 성분들 이외에 유효제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0026] 본 발명에 있어서, 상기 약학 조성물에 포함되는 첨가제의 함량은 특별히 한정되는 것은 아니며 통상의 제제화에 사용되는 함량 범위 내에서 적절하게 조절될 수 있다.

[0027] 상기 약학 조성물은 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립, 정제, 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 및 카타플라스마제로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 피부 외용제 형태로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0028] 본 발명의 약학 조성물은 제형화를 위해 추가로 있는 약학적으로 허용 가능한 담체 및 희석제를 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체 및 희석제는 전분, 당 및 만니톨과 같은 부형제, 칼슘 포스페이트 등과 같은 충전제 및 증량제, 카르복시메틸셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스 등과 같은 셀룰로오스 유도체, 젤라틴, 알긴산염, 폴리비닐 피롤리돈 등과 같은 결합제, 활석, 스테아린산 칼슘, 수소화 피마자유 및 폴리에틸렌글리콜과 같은 윤활제, 포비돈 및 크로스포비돈과 같은 봉해제, 폴리소르베이트, 세틸알코올, 글리세롤 등과 같은 계면활성제를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체 및 희석제는 대상체에 게 생물학적 및 생리학적으로 친화적인 것일 수 있다. 희석제의 예로는 염수, 수용성 완충액, 용매 및/또는 분산제(dispersion media)를 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0029] 본 발명의 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있다. 경구 투여일 경우, 정제, 트로키제(troches), 로젠지(lozenge), 수용성 현탁액, 유성 현탁액, 조제 분말, 과립, 에멀전, 하드 캡슐, 소프트 캡슐, 시럽, 엘릭시르제 등으로 제형화될 수 있다. 비경구 투여일 경우, 주사액, 좌제, 호흡기 흡입용 분말, 스프레이용 에어로졸제, 연고, 도포용 파우더, 오일, 크림 등으로 제형화 될 수 있다.

[0030] 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이 체질 특이성, 제제의 성질, 질병의 정도, 조성물의 투여시간, 투여방법, 투여기간 또는 간격, 배설율 및 약물 형태에 따라 그 범위가 다양할 수 있으며, 이 분야 통상의 기술자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 예컨대, 약 0.1 내지 10,000mg/kg의 범위일 수 있으나 이제 제한되지 않으며, 하루 일회 내지 수회에 나누어 투여될 수 있다.

[0031] 상기 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여되거나 비경구 투여(예를 들면, 정맥 내, 피하 내, 복강 내 또는 국소에 적용)될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 약학적 유효량 및 유효 투여량은 약학 조성물의 제제화 방법, 투여 방식, 투여 시간, 투여 경로 등에 의해 다양해질 수 있으며, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 투여는 하루에 1회 투여될 수 있고, 수회에 나누어 투여될 수도 있다.

[0032]

[0033] 또한, 본 발명은 CD244 발현 또는 활성을 억제시킨 단핵구(monocyte) 또는 대식세포(macrophage); 및 항암제를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 병용 투여 약학 조성물을 제공한다.

[0034] 상기 항암제는 세포독성항암제, 표적항암제 및 면역항암제로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 항암제일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0035] 상기 세포독성항암제는 독소루비신(doxorubicin), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 테모졸로마이드(temozolomide), 이리노테칸(irinotecan), 시스플라틴(cisplatin), 빈블라스틴(vinblastine), 빈크리스틴(vincristine), 액티노마이신-D(actinomycin-D), 5-플로로우라실(5-fluouracil), 도세탁셀(docetaxel), 카바지탁셀(cabazitaxel), 파클리탁셀(paclitaxel) 및 펌브롤리주맙(pembrolizumab)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0036] 상기 표적항암제는 트라메티닙(Trametinib), 베무라페닙(vemurafenib), 알펠리십(alpelisib), 닥톨리십(dactolisib), 게피티닙(Gefitinib), 엘로티닙(Erlotinib), 라파티닙(Lapatinib), 수니티닙(Sunitinib), 소라페닙(Sorafenib), 크리조티닙(Crizotinib), 다브라페닙(Dabrafenib), 트라스투주맙(Trastuzumab), 세툽시맙(Cetuximab), 베바시주맙(Bevacizumab), 파니투무맙(Panitumumab), 이필리무맙(Ipilimumab), 퍼투주맙(Pertuzumab), 토파시티닙(Tofacitinib), 이마티닙(Imatinib), 보르테조밐(Bortezomib), 오푸투무맙(Ofatumumab) 및 알렘투주맙(Alemtuzumab)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는

것은 아니다.

[0037] 상기 면역항암제는 항-PD-1, 항-PD-L1, 항-CTLA-4, 항-LAG-3, 항-TIGIT, 항-TIM-3, 항-GITR, CAR-T 및 NK cell로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0038]

[0039] 또한, 본 발명은 CD244 발현 또는 활성을 억제시킨 단핵구(monocyte) 또는 대식세포(macrophage)를 유효성분으로 포함하는 항암제 효능 증진용 조성물을 제공한다.

[0040]

[0041] 또한, 본 발명은 CD244 발현 또는 활성을 억제시킨 단핵구(monocyte) 또는 대식세포(macrophage)를 인간을 포함하는 개체에 단독 투여하거나 항암제와 병용 투여하는 단계를 포함하는 암 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0042]

[0043] 또한, 본 발명은 CD244 억제제 또는 CD244의 리간드인 CD48 억제제를 유효성분으로 포함하는 단핵구(monocyte)에서 대식세포(macrophage)로의 분화 유도용 조성물을 제공한다.

[0044] 상기 CD244 억제제 또는 CD48 억제제는 CD244 또는 CD48 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 앵타머, 항체 및 천연물로 이루어지는 군에서 선택되거나, CD244 또는 CD48 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 작은 간섭 RNA(small interfering RNA; siRNA), 안티센스 뉴클레오타이드 및 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA; shRNA)로 이루어지는 군에서 선택되는 것일 수 있다.

[0045] 상기 CD244 억제제는 인간 항-CD244 단일클론성 항체[ThermoFisher Scientific : #16-2449-81, BioLegend : #329502, R&D SYSTEMS : MAB10393-SP, BioVision : A1073-100, BD Biosciences : #550814] 또는 마우스 항-CD244 단일클론성 항체[ThermoFisher Scientific : #14-2441-82, BioLegend : #133501, BD Biosciences : #557451]일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0046] 상기 CD48 억제제는 인간 항-CD48 단일클론성 항체[ThermoFisher Scientific : #16-0489-81, BioLegend : #336702, R&D SYSTEMS : MAB36441-SP, BD Biosciences : #555758] 또는 마우스 항-CD48 단일클론성 항체[BioXcell : #BE0147, BioLegend : #103453, BD Biosciences : #553682]일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0047]

[0048] 또한, 본 발명은 후보물질을 세포에 처리하여 CD244 또는 이의 리간드인 CD48의 발현 또는 활성 억제를 분석하는 단계를 포함하는, 단핵구(monocyte)에서 대식세포(macrophage)로의 분화유도제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0049]

[0050] 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.

[0051]

[0052] [실험예 1] 동물 모델 제작

[0053] 동물을 사용한 모든 실험은 고려대학교 동물실험윤리위원회(승인번호 : KUIACUC-2019-0101)의 승인을 받았으며, 고려대학교 동물실험윤리위원회의 지침과 규정을 따랐다.

[0054] 야생형(WT)인 C57BL/6 마우스는 CD244 결핍 마우스의 대조군으로 사용되었고, Orient Bio(Orient Bio. Inc., 성남, 한국)에서 구입하였다. KO는 C57BL/6 배경의 CD244^{-/-} 마우스는 C57BL/6 CD244^{-/-} 마우스로 CD244가 모든 세포에서 결핍된 마우스이다. Flox는 C57BL/6 LysM^{+/+}-CD244^{f1/f1} 마우스이며 WT 마우스와 CD244 발현이 같은 대조군으로 사용되었고, Cyagen Biosciences에 의해 주문 제작하였다. cKO는 LysM^{cre/+}-CD244^{f1/f1}로 단핵구-대식세포 특이적인 CD244 결핍 마우스로, CD244^{f1/f1} 마우스를 Jackson Laboratory에서 구입한 Lyz2^{cre+}(B6.129P2-Lyz2tm1(cre)Ifo/J) 마우스와 교배하여 CD244^{f1/f1} 및 CD244^{f1/f1}-Lyz2^{cre+/-} 마우스를 생성하고 littermate control

마우스들을 CD244 conditional KO 마우스 실험에 사용하였다. 5~10주령의 암컷 마우스를 실험에 사용하였으며 모든 마우스는 고려대학교의 specific pathogen free 시설에서 사육 및 유지되었다.

[0055] B16F10 흑색종 세포주는 ATCC에서 구입하였다. Subcutaneous injection을 위해 1×10^6 개의 B16F10 세포를 마우스 측복부에 주사하였고, 주사 1~3주 내에 직경 1cm의 종양을 형성하는 것을 확인하였다. BMDM(bone Marrow-derived Macrophage) 및 항-PD-L1 항체 병용투여 실험을 위해, 6일간 WT과 CD244 KO 마우스의 골수세포를 50ng/ml 재조합 M-CSF(Peprotech)가 포함된 RPMI 배지에서 배양하였다. WT C57BL/6 마우스에 B16F10 종양 유도 7일, 10일 후에 각각 1×10^6 개의 WT 및 CD244 KO BMDM과 200 μ g의 항-PD-L1(BioXcell : #BE0101) 및 Isotype Rat IgG2ak 항체(BioXcell)를 복강주사하였다.

[0056]

[실험예 2] 세포 준비

[0058] 비장과 골수에서 single cell suspension을 획득한 후, ammonium chloride lysis buffer를 사용하여 적혈구를 제거하였다. 종양 조직의 single cell suspension에서 제조업체의 권장 사항(Miltenyi Biotec 및 GE Healthcare)에 따라 Mouse Tumor Dissociation Kit 및 percoll 밀도 구배 분리를 통해 면역세포를 분리하여 실험에 사용하였다.

[0059]

[실험예 3] CD11b+ 세포 및 단핵구(monocyte) 분리

[0061] CD11b+ 세포 분리를 위해, tumor single cell suspension을 biotin-항-CD11b 항체(Biolegend)와 streptavidin-magnetic beads(Miltenyi biotec)로 표지하고 MACS LS column(Miltenyi Biotec)을 사용하여 분리하였다. 마찬가지로 단핵구를 분리하기 위해 골수세포에서 단핵구 분리 키트(Miltenyi Biotec)를 사용하였다.

[0062]

[실험예 4] BMDM 및 종양 침윤성 단핵구의 분화

[0064] 분리된 단핵구, 전체 골수세포 또는 tumor lysate에서 분리된 CD11b+ 세포들을 10% FBS, 1% 페니실린/스트렙토마이신(penicillin/streptomycin), 1% 비필수 아미노산(NEAA), 10mM HEPES 및 20 μ M 2-Mercaptoethanol이 보충된 RPMI(Wellgene)에서 50ng/ml 재조합 M-CSF(Peprotech)를 처리하여 배양하였다. 일부 실험에서 20% v/v으로 B16F10 tumor explant supernatant를 사용하였다.

[0065]

[실험예 5] 유세포 분석(flow cytometry)

[0067] 일반적으로 최대 1×10^6 개의 세포를 실온에서 5분 동안 Fc-blocking antibody(항-CD16/CD32 항체, BioXcell : #BE0307)와 함께 배양했고, 4°C 암실에서 30분 동안 표면 단백질(surface protein) 염색을 수행했으며 세척(washing)을 위한 모든 원심분리는 1700rpm에서 5분 동안 진행하였다. 세포 내 IFN-gamma 염색의 경우, 종양 또는 TDLN의 분리된 CD45+ 또는 CD8+ 세포를 10gy로 gamma-irradiated된 B16F10 흑색종 세포 및 brefeldin-A와 함께 16시간 동안 공배양하여 재활성화 하였다. 이후 세포를 표면 염색한 뒤 제조업체의 권장 사항에 따라 BD fixation/permeabilization 키트를 사용하여 구멍을 뚫은 후 PE-항-IFN-g 항체(BD Biosciences)로 세포 내 염색하였다. FACS Canto II 유세포 분석기(BD Biosciences)를 사용하여 수집된 데이터는 FlowJo software(Tristar)로 분석하였다.

[0068]

[실험예 6] Quantitative PCR

[0070] 조직 및 세포의 전체 RNA를 TRIzol 시약(Invitrogen)으로 추출하였다. cDNA는 aTOPscript™ cDNA 합성 키트(Enzynomics)를 사용하여 합성하였다. Real-time PCR은 StepOne Plus™(Applied Biosystems) 기기에서 SYBR green(Bio-rad)을 사용하여 수행하였다. 유전자 발현은 GAPDH mRNA 발현량을 기준으로 정규화되었고, 상대 발현 수준은 $\Delta \Delta CT$ 방법에 따라 계산하였다.

[0071]

[0072] [실험예 7] ELISPOT

[0073] OT-1 형질전환 마우스로부터 얻은 5×10^4 개의 림프절 세포를 분화 3일째의 BMDM 및 OVA 펩타이드(SIINFEKL; 1 μ g/ml)와 다양한 비율로 공배양하였다. 세포를 마우스 IFN- γ ELISPOT PLUS kit(ALP)(MABTECH)에 플레이팅하고 48시간 후에 ELISPOT reader system(Autoimmun Diagnostika GmbH)으로 IFN- γ spot을 검출하였다.

[0074]

[0075] [실험예 8] Statistical analyses

[0076] 모든 데이터는 평균 $\pm$ 표준 오차(S.E.M)로 표시되었다. 통계적 유의성은 쌍을 이루지 않은 양측 t-검정, 이원 분산 분석에 의해 결정되었다. 유의성은 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 로 정의하였다. 모든 분석은 Prism 7.0 소프트웨어 (GraphPadSoftware, Inc)를 사용하여 수행되었다.

[0077]

[0078] [실험예 9] Antigen presentation assay

[0079] BMDM 분화 2일 후, 1mg/ml의 whole-OVA protein을 첨가하였다. OVA 펩타이드가 결합된 MHCI 복합체와 MHCII를 항-H-2kb-SIINFEKL 항체(Biolegend : #141604) 및 항-MHCII 항체(Biolegend : #107622)로 표지하고 유세포 분석기를 통해 발현량을 측정하였다.

[0080]

[0081] [실험예 10] Phagocytosis assay

[0082] BMDM 분화 2일 후, 5 μ M CFSE로 염색된 gamma-irradiated B16F10 세포와 24시간 동안 공배양 하였다. 유세포 분석기를 통해 CD45+, CD11b+, Ly6Chi 및 F4/80low 단핵구와 CD45+, CD11b+, Ly6Clow 및 F4/80high 대식세포에서 488/519 channel을 통해 CFSE 형광을 검출하였다.

[0083]

[0084] [실험예 11] Fluorescence microscopy

[0085] 공초점 접시에서 배양된 BMDM 세포를 고정하고 4.2% 파라포름알데히드 용액으로 세포막을 천공한 후 항-LC3B 항체(abcam : #ab51520)(1:200) 및 Hoechst 33342(Invitrogen : #H3570)(1000:1)로 염색하였다. 2시간 인큐베이션 후, 세포를 세척하고 Alexa555-Rabbit IgG 2차 항체(Invitrogen : #A27039)로 염색하고 실온에서 1시간 인큐베이션 하였다. 모든 이미지는 63X 오일 침지 렌즈가 장착된 LSM700 공초점 레이저 주사현미경(Carl Zeiss)으로 기록하였다.

[0086]

[0087] [실험예 12] Single-cell RNA 염기서열 데이터 분석

[0088] Immune checkpoint blockade 치료에 반응성 및 면역세포의 변화에 대한 scRNA seq 연구의 데이터를 분석하였다. Seurat v4 R package를 사용하여 immune checkpoint blockade 투약 전 코호트에서 5,928개 세포의 클러스터링을 수행하였다. 이후 환자들의 단핵구-대식세포의 CD244의 평균 발현 수준에 따라 환자들을 CD244 high 및 low expressor로 분류하였다. 비교적 높은 평균 발현과 세포 간 발현 차이가 높은 유전자만을 추려 다운스트림 클러스터링 분석에 사용하였다. 차원 축소에는 PCA(Principal component analysis)를 사용하고 내장된 JackStraw 기능을 사용하여 중요한 주성분 수를 계산하였다. T-분산 확률적 이웃 임베딩(t-SNE) 및 균일 매니폴드 근사 및 투영(UMAP)을 2차원 데이터 시각화에 사용하였다. Seurat 패키지에 내장된 FindMarkers 기능은 차등적으로 발현되는 유전자를 식별하는 데 사용하였다. Seurat 패키지의 결과로부터 P 값이 0.05 미만인 유전자를 차등적으로 발현된 유전자로 간주하였다. 각 population의 차등 발현 유전자 및 유전자 발현 랭크를 IPA 소프트웨어(QIAGEN Inc.) 및 fgsea R package를 통해 신호전달 경로 및 gene signature 분석을 수행하였다.

[0089]

[0090] [실시예 1] 마우스 흑색종 모델을 대상으로 한 CD244 억제를 통한 항암 효과 분석

[0091] 단핵구(monocyte)에서 발현하는 CD244가 종양 진행에 영향을 미치는지 확인하기 위해, 종양 내 단핵구에서 CD244 발현이 높아지는지 확인하였다. C57BL/6 마우스의 측복부에 마우스 동종 흑색종 세포인 B16F10 세포를 1

$\times 10^6$ 을 피하주사하여 종양모델을 구축하고, 14일 후 종양 내 면역세포들의 CD244 발현량을 정상 C57BL/6 마우스의 피부 내 면역세포들과 비교하였다. 그 결과, 자연살해세포(natural killer cell; 이하 NK 세포라 함) 및 수지상세포(dendritic cell; 이하 DC라 함)에서는 종양 유무에 관계없이 CD244 발현이 높은 반면, 단핵구는 정상 피부조직에서는 CD244 발현이 거의 나타나지 않고, 종양 유도 후 CD244 발현이 크게 높아지는 것을 확인하였다(도 1a-A).

[0092] 또한, 종양 유도 후 단핵구에서 CD244 발현이 높아지는 현상이 종양 성장에 영향을 주는지 확인하기 위해, C57BL/6 또는 C57BL/6 CD244^{-/-} 마우스의 측복부에 B16F10 1×10^6 을 피하주사하여 종양모델을 구축한 후, 14일 동안 종양의 성장을 관찰하였다. 종양의 크기는 버니어 캘리퍼스를 사용하여 종양 조직의 가로×세로×높이/2로 계산하였다. 그 결과, CD244^{-/-} 마우스에서 종양의 성장이 유의하게 억제되는 것을 확인하였다(도 1a-B).

[0093] 또한, CD244는 단핵구 외에도 다양한 면역세포들에서 발현하고 있기 때문에 단핵구에서 발현하는 CD244의 보다 특이적인 영향을 확인하기 위해, 단핵구-대식세포 특이적으로 발현하는 LysM 유전자와 Cre recombinase가 같이 발현되는 LysM-cre 마우스와 CD244 유전자의 앞뒤에 Cre recombinase가 자를 수 있는 유전자 시퀀스인 flox 서열이 부착된 CD244 flox 마우스를 교배하여 단핵구-대식세포 특이적 CD244 결핍 마우스를 제작하였다(도 1b-C). 대조군인 CD244^{f1/f1}(이하 Flox라 함)와 실험군인 LysM^{cre}-CD244^{f1/f1}(이하 cKO라 함)에 도 1a-B와 동일하게 흑색종을 유도하였다. 그 결과, 실험군인 단핵구-대식세포 특이적 CD244 결핍 마우스에서 종양의 성장이 유의하게 억제되는 것을 확인하였다(도 1b-D).

[0094]

[실시예 2] CD244 결핍 단핵구/대식세포의 T cell 활성 변화 분석

[0096] 단핵구-대식세포에서 발현하는 CD244가 항종양면역반응을 어떻게 억제하는지 확인하기 위해, 가장 대표적인 항종양면역반응인 T cell의 활성을 확인하였다. Flox 및 cKO 마우스에 도 1b-D와 동일하게 흑색종을 유도하고, 14일 후 종양을 적출하여 유세포분석기를 통해 분석하였다. 그 결과, CD8 및 CD4 T 세포와 NK 세포의 비율에는 차이가 없었으나, cKO 마우스에서 CD8 및 CD4 T 세포들이 항종양면역반응에 중심적인 역할을 하는 IFN- γ 를 대조군(Flox) 대비 더 많이 발현하는 것을 확인하였다(도 2a). 또한, 종양세포를 직접 살상하는 단백질인 granzyme-b 발현이 cKO 마우스의 CD8 T 세포에서 유의하게 높아진 것을 확인하였다(도 2b-C). 이러한 차이는 cKO 마우스에서 흑색종 항원인 gp100에 특이적인 T 세포 수용체를 발현하는 항원 특이적 CD8 세포가 증가하기 때문임을 H-2Db gp100 tetramer를 사용한 염색을 통해서 확인하였다(도 2b-D). 또한, 기억 T 세포의 마커인 CD44 발현이 cKO 마우스의 CD8 T 세포에서 더 높은 것을 확인하였다(도 2b-E).

[0097]

[실시예 3] CD244 결핍 마우스의 단핵구/대식세포 분포 및 분화 변화 분석

[0099] 대조군인 Flox 마우스와 실험군인 cKO 마우스의 종양을 적출한 후 유세포분석을 통해 종양 침윤 면역세포의 분포를 확인하였다. 그 결과, 전체 골수성 면역세포인 CD11b⁺ 세포, 호중구(neutrophil) 및 DC 세포의 비율에는 차이가 없었으나, cKO 마우스에서 단핵구가 유의하게 감소하고 대식세포가 유의하게 증가하는 것을 확인하였다(도 3a-A).

[0100] CD244가 단핵구가 대식세포로 분화하는 과정을 조절하는지 확인하기 위해, C57BL/6 또는 C57BL/6 CD244^{-/-} 마우스의 골수세포에 M-CSF를 처리하여 분화시키는 BMDM 실험을 진행하였다. 3일 후 대식세포의 비율과 수를 측정할 결과, CD244^{-/-} BMDM의 대식세포가 대조군(WT)에 비해 유의하게 증가하였다(도 3a-B). 또한, 골수 내 단핵구와 종양 내 단핵구의 생리학적 특징이 크게 다를 것을 염두하여 종양 내 단핵구를 분리한 후 M-CSF를 처리하였을 때에도 마찬가지로 대식세포의 비율과 수가 크게 증가한 것을 확인하였다(도 3b).

[0101] 또한, 종양미세환경에서도 CD244가 단핵구-대식세포 분화를 조절하는지 직접적으로 확인하기 위해, C57BL/6 CD45.1 WT 및 C57BL/6 CD45.2 CD244^{-/-} 마우스의 골수에서 단핵구를 분리한 후 Cell trace far red 염색약으로 염색한 뒤 1:1 비율로 섞어서 C57BL/6 CD45.2 마우스의 종양에 직접 주사하였다(도 3c-D). 24시간 후 종양 내에서 Cell trace far red로 염색된 CD45.1 WT 및 CD45.2 CD244^{-/-} 세포들을 확인한 결과, CD244^{-/-} 단핵구가 대식세포로 현저히 많이 분화한 것을 확인하였다(도 3c-E).

[0102] CD244가 리간드인 CD48과의 상호작용 및 하위 신호전달을 통해 단핵구-대식세포의 분화를 억제하는지 확인하기 위해, 골수유래 대식세포 분화 실험에 CD244의 리간드인 CD48을 차단하는 항-CD48 항체(Biolegend : #103453)를 처리하였다. 그 결과 CD244^{-/-}에서는 대식세포의 수가 크게 변화하지 않았지만 WT 마우스에서는 현저히 증가하는 것을 확인하였다(도 3c-F).

[0103]

[실시예 4] CD244 결핍 단핵구/대식세포의 적응면역반응 활성 저해 기전 분석

[0105] CD244가 단핵구-대식세포의 적응면역반응 활성을 어떻게 저해하는지 확인하기 위해, 대조군인 Flox 마우스와 실험군인 cKO 마우스의 종양을 적출한 후 유세포분석 및 real-time PCR을 통해 M1 및 M2 대식세포의 마커를 분석하였다. 그 결과, 대조군(Flox) 대비 실험군(cKO)에서 M1 대식세포 마커(CD80, IL-6, NOS2 및 IFNB1) 발현은 증가한 반면(도 4a-A 및 도 4a-B), M2 대식세포의 마커(CD206, ARG1, TGFB1)는 유의한 발현 변화가 나타나지 않았다(도 4a-C 및 도 4a-D).

[0106] 또한, CD244에 의해 M1 대식세포의 핵심적인 기능인 항원제시가 조절되는지 확인하기 위해, 2일 동안 분화시킨 BMDM에 오발부민(Ovalbumin; 이하 ova라 함) 단백질을 처리하여 24시간 동안 배양하여 항원제시 정도를 확인하였다. 그 결과, CD244 결핍 대식세포에서 MHCII-ova 복합체(complex)의 발현이 유의하게 증가하였고(도 4a-E), CD244 결핍 마우스에서 대식세포의 수가 증가하는 현상과 결부되어 MHCII-ova 복합체를 발현하는 대식세포의 숫자가 WT 마우스 대비 CD244 결핍 마우스의 BMDM에서 유의하게 증가하였다(도 4a-F). 또한, 항원제시에 필수적인 공자극 분자들의 발현을 CD244가 조절하는지 확인하였을 때 CD244 결핍 대식세포에서 CD80의 발현이 높은 것을 확인하였다(도 4b-G). cKO 마우스의 종양 내에서 항원특이적인 CD8 T 세포가 증가한 것이 CD244가 대식세포의 항원제시를 억제하기 때문인지 확인하기 위해, 체외에서 분화시킨 골수유래 대식세포와 ova를 인식하는 OT-1 T 세포를 공배양하고, ova 펩타이드를 넣어주었을 때, CD244 결핍 대식세포와 공배양한 경우에 T 세포 특이적 IFN-g 분비가 증가하는 것을 확인하였다(도 4b-H).

[0107] 다음으로 대식세포가 항종양면역반응에 관여하는 중요한 기전이며 항원제시를 위해 선행되어야 하는 식세포작용의 발생 정도를 확인하기 위해, 2일 동안 분화시킨 BMDM과 10gy로 감마선을 조사한 후 CFSE로 형광 표지한 B16F10을 24시간 동안 공배양하였다. 이후 BMDM에서 발현하는 CFSE 형광을 유세포분석기로 측정한 결과, CD244 결핍 단핵구와 대식세포 모두 식세포 작용이 대조군(WT) 대비 유의하게 증가한 것을 확인하였다(도 4b-I 및 도 4b-J).

[0108]

[실시예 5] 종양 유도 시 단핵구에서 CD244 발현이 높아지는 원인 분석

[0110] 도 1a-A에서 종양 유도 시 단핵구의 CD244 발현이 높아지는 현상의 원인과 CD244가 단핵구-대식세포의 분화 및 기능을 억제하는 분자적 기전을 확인하기 위해, 공공 데이터베이스의 마우스 종양모델 단일세포 전사체 분석 데이터 (GSE121861)를 분석하였다. 대표적인 마커 발현 패턴을 통해 7개의 CD45 (PTPRC)+ 면역 세포 클러스터를 구분하고, 그 중 단핵구(LY6C2, CCR2 및 IL1B), 미성숙 단핵구(S100A9 및 OLR1), 대식세포(ADGRE1 및 CSF1R), M1(H2-Aa, H2Ab1, CX3CR1, CD86 및 APOE) 및 M2(ARG1, TREM 2 및 SPP1) 대식세포와 같이 알려진 마커의 발현량을 확인하여 4개의 단핵구 계통 세포들의 하위 클러스터를 확인하였다(도 5a-A 및 도 5a-B). Pathway enrichment 분석을 통해 미성숙 단핵구는 면역 반응, 분화, 단백질 폴딩과 관련된 유전자를 정상 단핵구에 비해 낮게 발현하는 것으로 나타났다(도 5a-C). 4개의 단핵구 계통 세포들의 하위 그룹에서 CD244 발현을 확인한 결과, 정상 단핵구 및 M1/M2 대식세포와 비교하여 미성숙 단핵구에서 CD244 발현이 상당히 높아진 것을 확인하였다(도 5a-D 및 도 5a-E). 또한, CD244를 낮게 발현하는 미성숙 단핵구와 비교하였을 때 CD244를 높게 발현하는 미성숙 단핵구에서 ER stress pathway가 상향조절되어 있는 것을 확인하였다(도 5f). ER stress pathway는 면역억제성 미성숙 단핵구 발생에 주요한 기전 중 하나로 미성숙 단핵구에서 CD244 발현 또한 조절하고 있을 것으로 가정하고, BMDM에 ER stress 유도제인 타프시가진(Thapsigargin)을 처리하였을 때 단핵구에서 CD244 발현이 증가하며 대식세포로의 분화가 감소하였다. 반면에 ER stress 저해제인 타우로우루소디옥시콜릭산(Tauroursodeoxycholic acid)을 처리하였을 때에는 단핵구에서 CD244 발현이 감소하고, 대식세포로의 분화가 증가하는 것을 확인하였다(도 5b-G 및 도 5b-H).

[0111]

[실시예 6] CD244에 의해 조절되는 분자적 기전 분석

- [0113] CD244가 단핵구-대식세포의 분화, 항원 제시 및 식세포 작용을 어떻게 억제하는지 확인하기 위해, CD244의 신호 전달 분자들의 발현을 실시예 5의 단일세포 전사체 분석 데이터에서 확인하였다. 그 결과, T 세포 및 NK 세포에 비해 단핵구 대식세포에서는 SAP, EAT-2, ERT 및 SHP-2의 발현이 낮고, Beclin-1의 발현이 높은 것을 확인하였다(도 6a-A). 또한, WT 및 CD244 결핍 BMDM에서 자가포식작용 발생 정도를 확인하였다. 우선 자가포식작용이 시작되기 위해 필요한 과정인 LC3의 lipidation을 확인하기 위해, WT과 CD244 KO BMDM을 항-LC3B 항체(abcam : #ab51520)로 염색하여 형광현미경과 유세포 분석기를 통해 관찰한 결과, CD244 KO BMDM에서 LC3 lipidation이 현저히 증가한 것을 확인하였다(도 6a-B 및 도 6a-C). LC3B에 의해 실제 형성된 자가포식소체의 양을 cyto-ID 염색을 통해 정량한 결과에서도 마찬가지로 CD244 KO BMDM에서 현저히 증가한 것을 확인하였다(도 6a-D).
- [0114] 다음으로, 자가포식작용을 조절하였을 때 BMDM의 분화 정도가 변화하는 것을 확인하기 위해, 자가포식작용 조절 약물을 처리하였다. 자가포식소체와 리소좀의 융합을 방해하여 자가포식작용의 마지막 단계를 저해하는 클로로 퀴(Chloroquine) 처리 시, WT과 CD244 KO BMDM 모두 대식세포의 수가 현저히 감소하였다(도 6b-E 및 도 6b-F). 또한, CD244와 결합하는 또 다른 분자인 vps-34의 저해제인 Ly294002를 처리하였을 때에도 대식세포의 수가 감소하며, WT과 CD244^{-/-} BMDM 간의 LC3B 발현 차이가 사라지는 것을 확인하였다(도 6b-G 및 도 6b-H). 상기 결과로부터, CD244가 자가포식작용을 억제함으로써 단핵구의 대식세포로의 분화를 억제하는 것을 확인하였다.
- [0115]
- [0116] **[실시예 7] CD244 결핍 단핵구/대식세포 및 항 PD-L1 항체 병용투여를 통한 항암 효과 분석**
- [0117] 상기 결과들을 통해 CD244가 종양미세환경에 단핵구를 축적시키고 이후 대식세포로의 분화 및 항원제시와 식세포작용을 감소시킴으로써 항종양 면역 반응을 억제한다는 사실을 확인하였고, 이에 따라 CD244 결핍 대식세포를 면역학적으로 "차가운" 종양을 "뜨거운" 종양으로 전환하는 치료 방법으로 활용할 수 있는 가능성에 대해 실험을 진행하였다. 우선, 단핵구 계통 특이적인 CD244 결핍 마우스(cKO)와 대조군인 Flox 마우스에 B16F10 흑색종을 유도한 후, 항PD-L1 항체를 처리하였다. 그 결과, Flox 마우스의 종양은 항PD-L1 항체 치료에 유의미한 변화를 보이지 않았다. 그러나, 항PD-L1 항체 치료는 아이소타입(Isotype) 항체 치료에 비해 cKO 마우스에서 종양의 크기를 더욱 감소시켰다(도 7a-A). 종양 내부 T 세포들의 비율을 측정하였을 때 항 PD-L1 항체를 cKO 마우스에 처리한 경우에만 CD8 T 세포들의 비율이 크게 증가하는 것을 확인하였다(도 7a-B). 또한, 항PD-L1 항체를 처리한 cKO 마우스의 TDLN에서 T 세포의 기억 표현형을 분석한 결과, 항PD-L1 항체를 Flox 마우스에 처리했을 때에 비해 central memory(CD62L⁺, CD44⁺) CD8 T 세포와 effector memory(CD62L⁻, CD44⁺) CD4 T 세포군이 현저하게 증가하였다(도 7b). 또한, PD-1을 발현하고 TIGIT(T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains)을 발현하지 않는 T 세포의 비율은 항PD-L1 항체를 주사한 cKO 마우스의 종양에서만 현저하게 증가한 반면, PD-1/TIGIT 이중양성 C D8 T세포의 비율은 유의미한 변화를 보이지 않았다(도 7c-D). 일반적으로 PD-1은 항원 특이적으로 활성화된 T cell에서 모두 발현되는 면역관문 수용체인데 반해 TIGIT은 심각하게 탈진된 T cell에서만 발현되는 것으로 알려져 있으므로 상기 결과를 통해 cKO 마우스에 항-PD-L1 항체를 처리하는 경우 종양 내 CD8 T cell의 활성이 증가하지만 면역 탈진 현상은 증가하지 않는 것을 확인하였다.
- [0118] CD244 결핍 대식세포의 항종양 면역 세포치료제로써의 가능성을 알아보기 위해, B16F10 흑색종을 가진 WT 마우스에 항PD-L1 항체와 CD244^{-/-} BMDM 세포를 동시에 주입하였다. Isotype 항체와 CD244^{-/-} BMDM을 함께 처리하였을 때는 종양 성장을 약간 억제하였으나 CD244^{-/-} BMDM과 항PD-L1 항체의 병용투여는 B16F10 종양의 성장을 현저히 감소시켰으며 또 다른 cold tumor 모델인 LL2(Lewis lung carcinoma)에서도 같은 결과를 확인하였다(도 7c-E). 상기 결과를 통해, CD244 결핍 대식세포가 T 세포의 활성화와 메모리(memory) 표현형을 증가시키고 종양 내 CD8 T 세포를 증가시키며, 흑색종을 비롯한 종양 모델에서 면역관문억제제에 대한 반응성을 향상시킨다는 것을 확인하였다.
- [0119]
- [0120] **[실시예 8] 흑색종 환자 대상으로 한 CD244 결핍 단핵구/대식세포의 항암 효과 분석**
- [0121] 종양미세환경 내 단핵구/대식세포에 대한 면역 관문 수용체로서 CD244의 임상적 의의를 확인하기 위해 공공 데이터베이스의 인간 흑색종 조직에서 분리된 CD45⁺ 면역 세포의 single cell RNA sequencing 데이터 세트(SCP398)를 분석하였다. 기존 연구에서 보고된 16,291개의 세포 중에서 단핵구와 대식세포로 분류된 1,391개의 세포를 사용하였다. 이 세포들에서 CD244를 발현하지 않는 단핵구/대식세포를 식별하기 위해, seurat에서 shared nearest neighbor clustering method를 사용하여 7개의 하위 그룹으로 추가로 분류하였다(도 8a-A). 그

다음으로 CD244 발현에 따라 1) CD244를 발현하는 세포들의 비율이 상대적으로 높은 C0-1, 2) CD244를 발현하는 세포들의 비율이 상대적으로 낮은 C2-3, 3) CD244 발현이 없는 C4-6의 세 그룹으로 분류하였다(도 8a-B). 이러한 그룹 중에서, 두 세포 유형 간의 공정한 비교를 위해 상당한 수의 CD244+와 CD244- 단핵구/대식세포를 가진 C0-1를 사용하였다. 총 511개의 유전자와 221개의 유전자가 CD244+와 CD244-단구/대식세포에서 각각 상향 및 하향조절된 것을 확인하였다(도 8a-C). CD244-단핵구/대식세포에서 주로 발현된 221개 유전자는 식세포작용(phagosome), 항원처리 및 제시, autophagy와 주로 관련이 있었으며(도 8a-D), 이는 마우스 모델에서 발견한 결과와 일치하였다. 다음으로, 단핵구/대식세포에서 CD244의 발현 정도가 환자의 생존율에 영향을 주는지 확인하고자 하였다. 이를 위해 The Cancer Genome Atlas 데이터베이스에서 흑색종 환자 470명(1차 종양 103명, 전이 종양 367명)의 종양 조직에서 생성된 bulk RNA-seq 데이터 세트를 얻었다(TCGA-SKCM, 도 8b-E). 그런 다음 bulk RNA-seq 데이터 세트에서 앞의 scRNA-seq 분석에서 식별된 4개의 세포 유형의 비율을 추정하기 위해 4개의 세포 유형에서 특이적으로 상향 조절된 유전자(DEG)를 확인하였고 CIBERSORTx를 통해 TCGA 데이터세트를 deconvolution 분석하였다(도 8b-F). 그런 다음 CD244를 발현하지 않는 단핵구/대식세포가 있는 환자와 없는 환자의 생존율을 비교하여 원발암 및 전이암 코호트 모두에서 CD244를 발현하지 않는 단핵구/대식세포를 가진 환자들보다 그렇지 않은 환자들보다 전반적인 생존율이 현저히 높은 것을 확인하였다(도 8b-G).

[0122] 다음으로, CD244발현이 낮은 단핵구/대식세포가 마우스 모델에서와 유사하게 인간에서도 T 세포의 항원 특이적 활성을 향상시킬 수 있는지 확인하고자 하였다. 앞의 scRNA-seq 데이터 세트에서 개별 환자들을 단핵구/대식세포에서의 CD244 평균 발현량에 따라 CD244 high와 CD244 low 그룹으로 분류하고, T세포에서의 CD244 발현에 관계없이 CD244 high와 low 그룹 간의 CD8 T세포를 비교하였다(도 8c-H). 이를 통해 CD244 low 그룹의 CD8 T세포에서 주로 상향조절된 207개의 유전자를 얻었고, 이 유전자들은 주로 사이토카인 신호전달, TCR 신호전달 및 적응면역체계와 연관되어 있는 것을 확인하였다(도 8c-I).

[0123]

[실시예 9] 다른 암종에서 단핵구-대식세포의 기능에 CD244가 미치는 영향 분석

[0124]

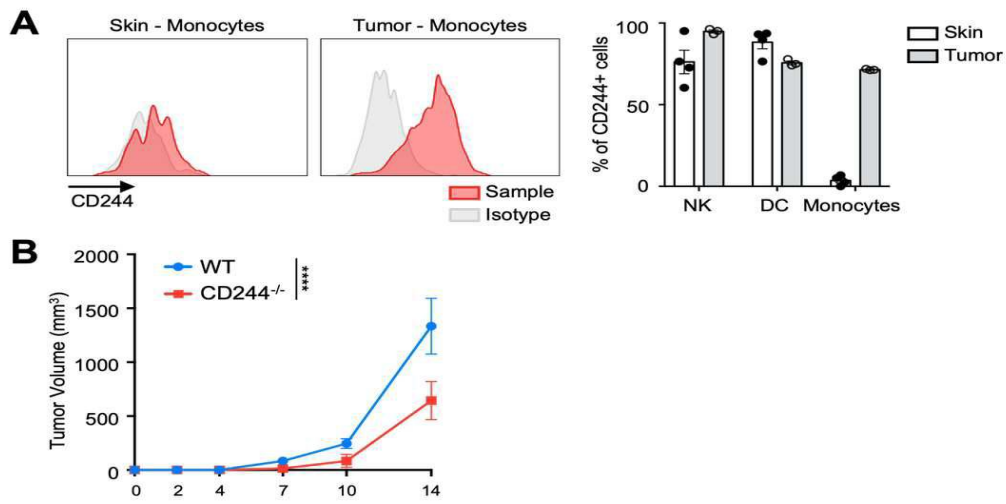
[0125] 마지막으로, 흑색종 모델 및 전사체 분석 데이터를 통해 확인한 단핵구 계열 세포들에서 발현하는 CD244에 대한 결과가 다른 암종 모델로 확장될 수 있는지 확인하였다. 이를 위해, 대장암(SCP1162)(도 9a), 비소세포 폐암(GSE127465)(도 9b) 및 교모세포종(GSE131928)(도 9c) 환자의 단일세포 전사체 분석 데이터 세트를 분석하였다. CD244를 발현하지 않는 단핵구/대식세포들의 DEG를 사용하여 Pathway enrichment analysis를 실시한 결과 흑색종 외의 암종에서도 CD244가 단핵구-대식세포에서 선천면역체계, 식세포작용, 항원 제시 및 자가포식을 조절하는 것을 확인하였다.

[0126]

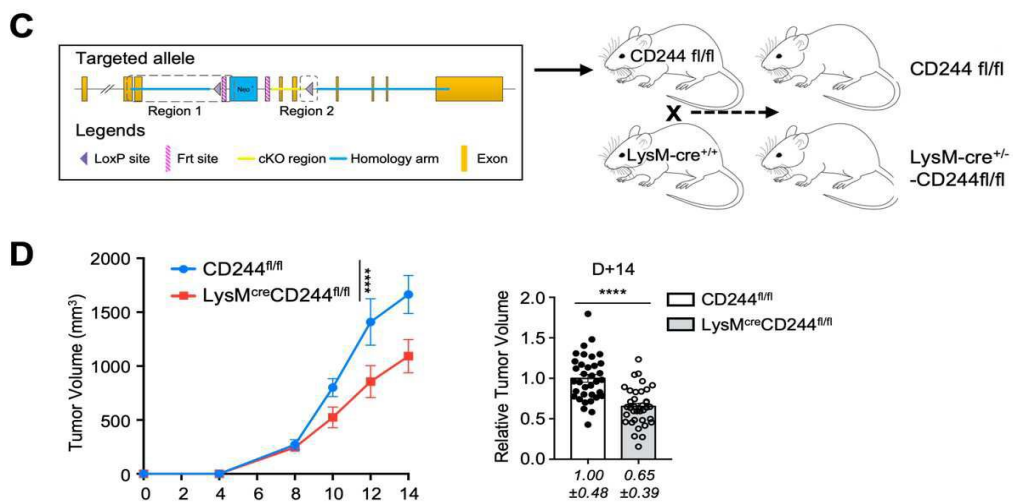
[0127] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

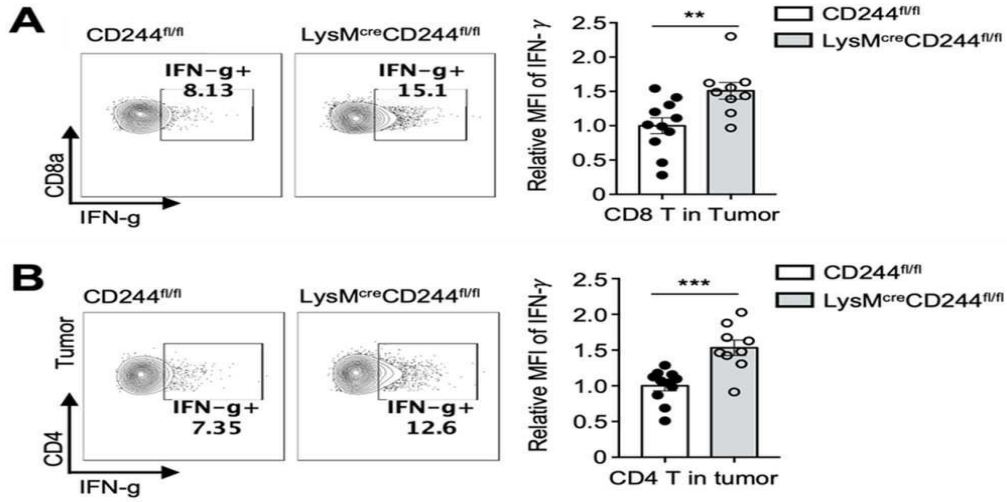
도면1a



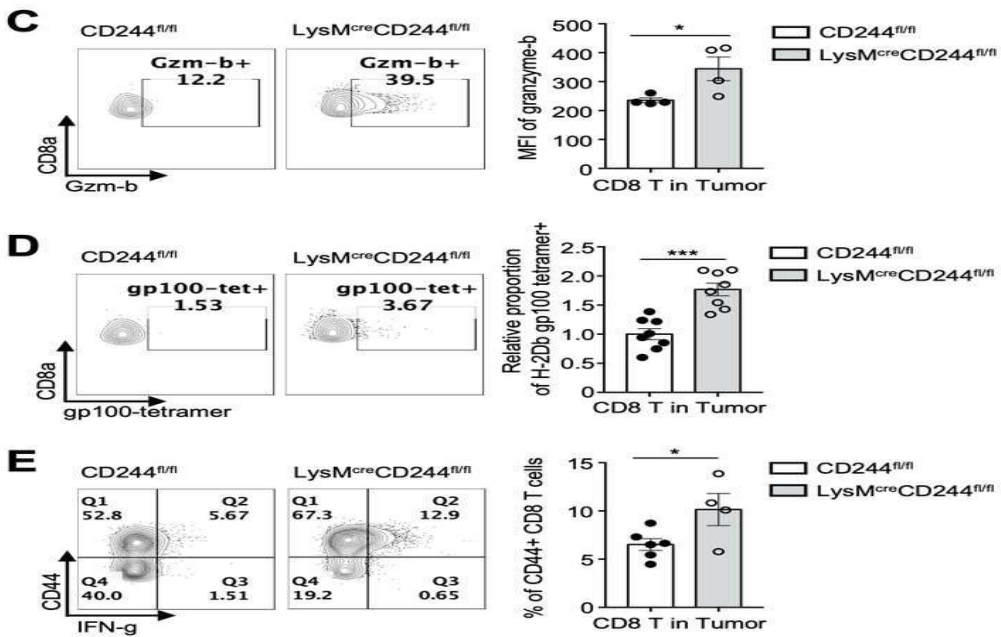
도면1b



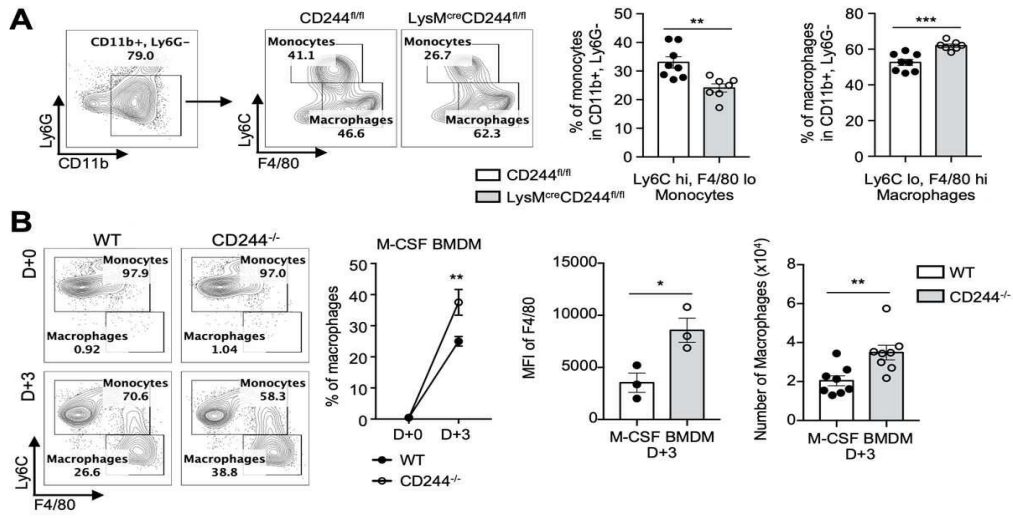
도면2a



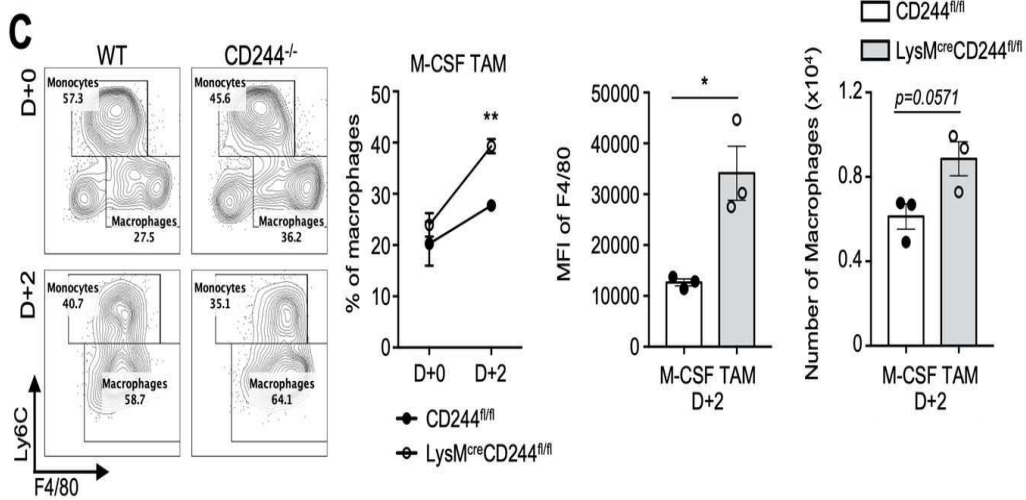
도면2b



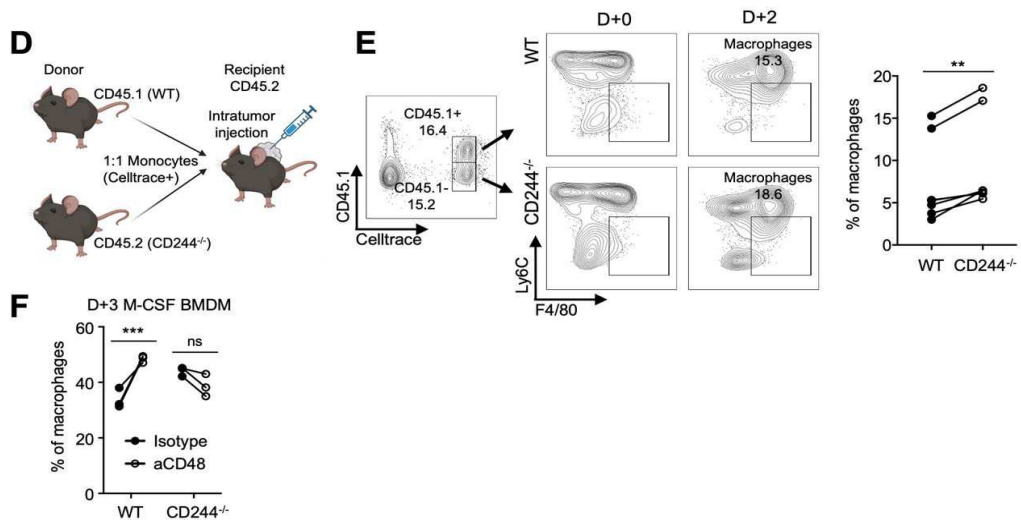
도면3a



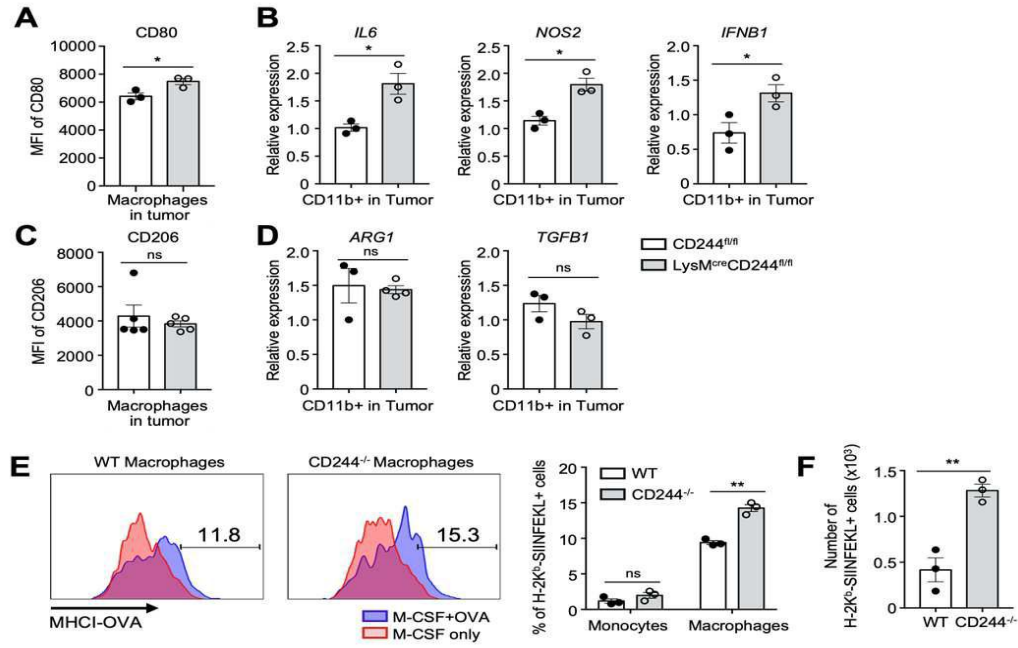
도면3b



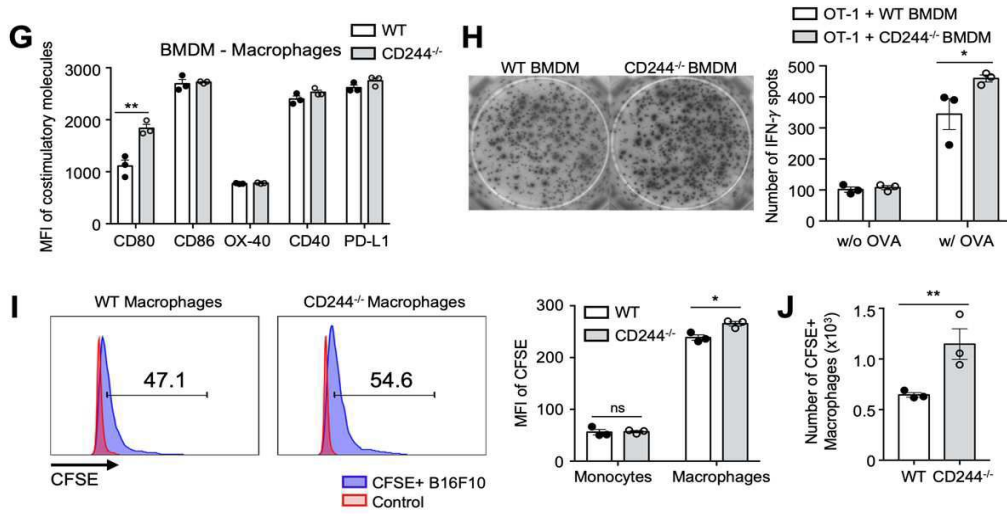
도면3c



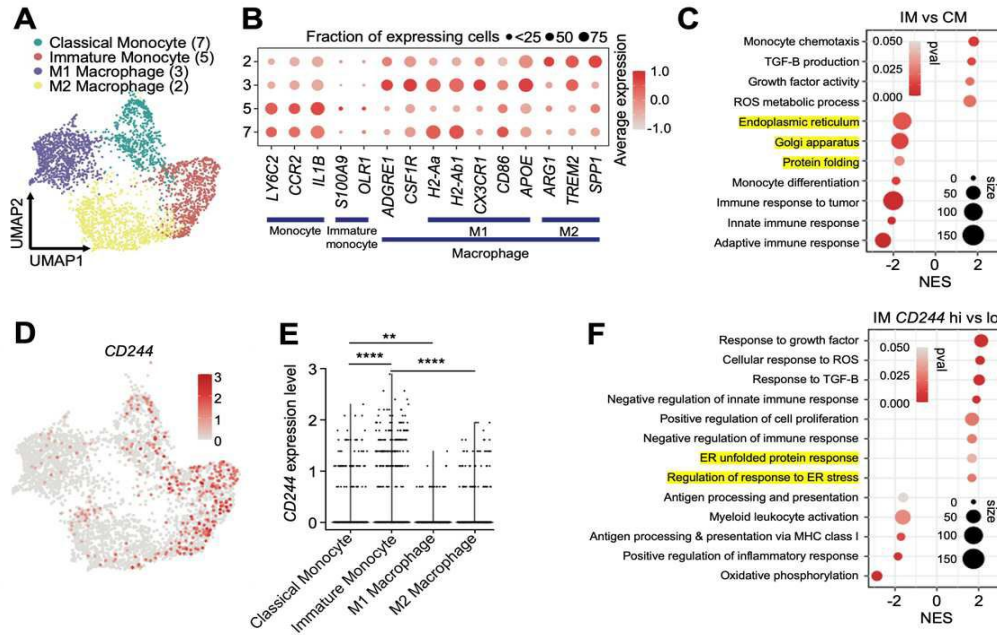
도면4a



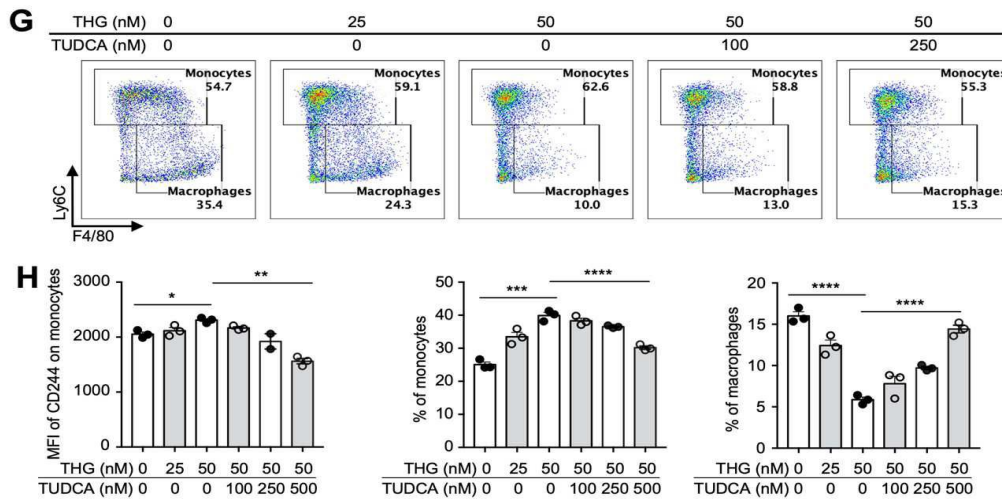
도면4b



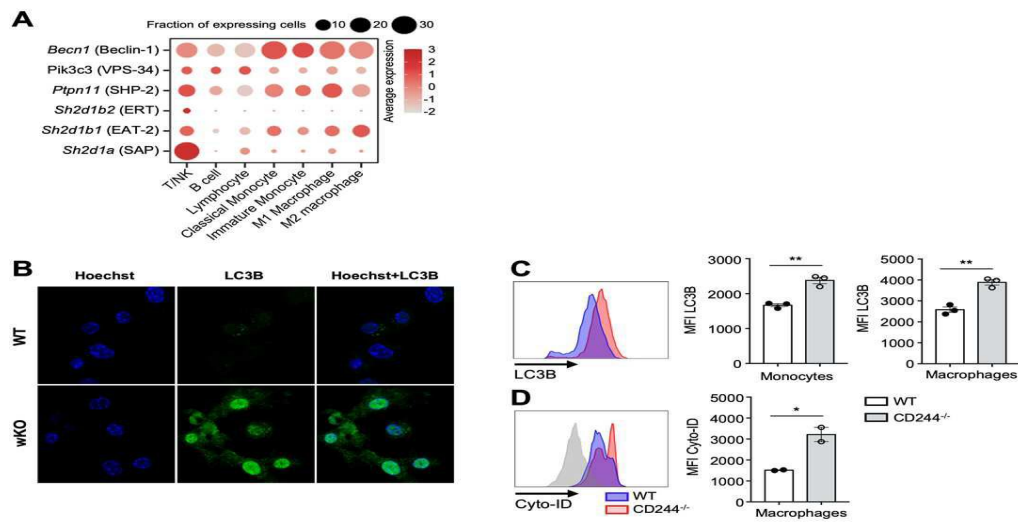
도면5a



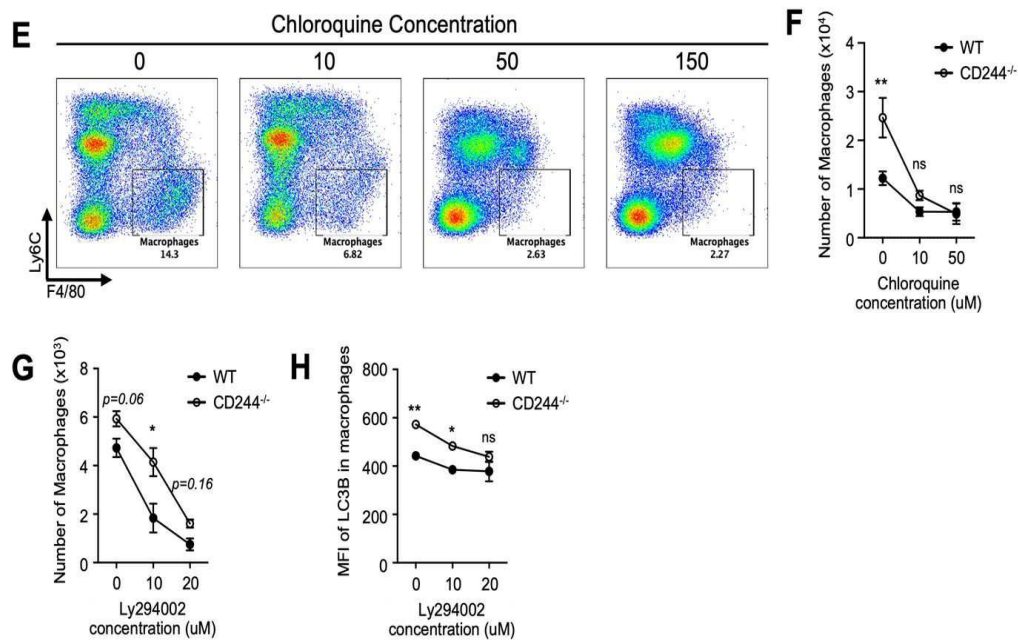
도면5b



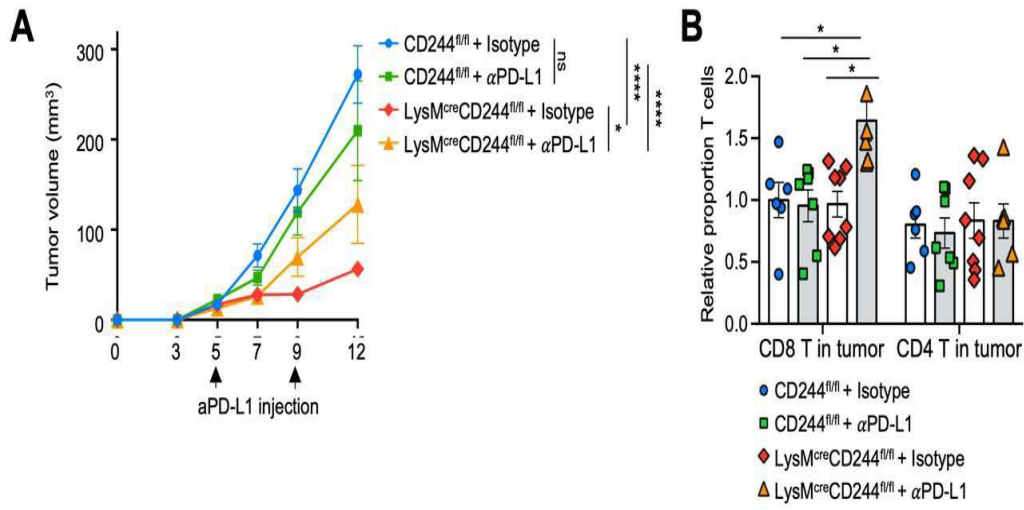
도면6a



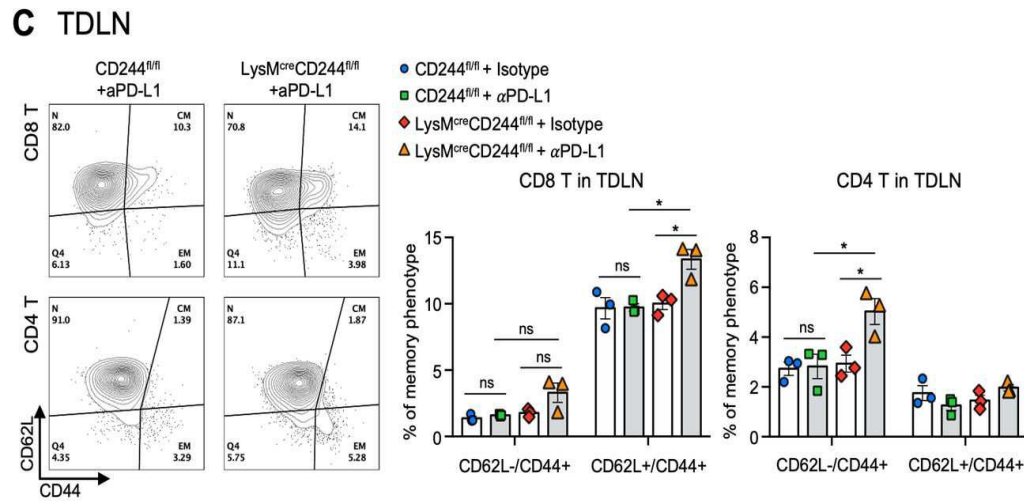
도면6b



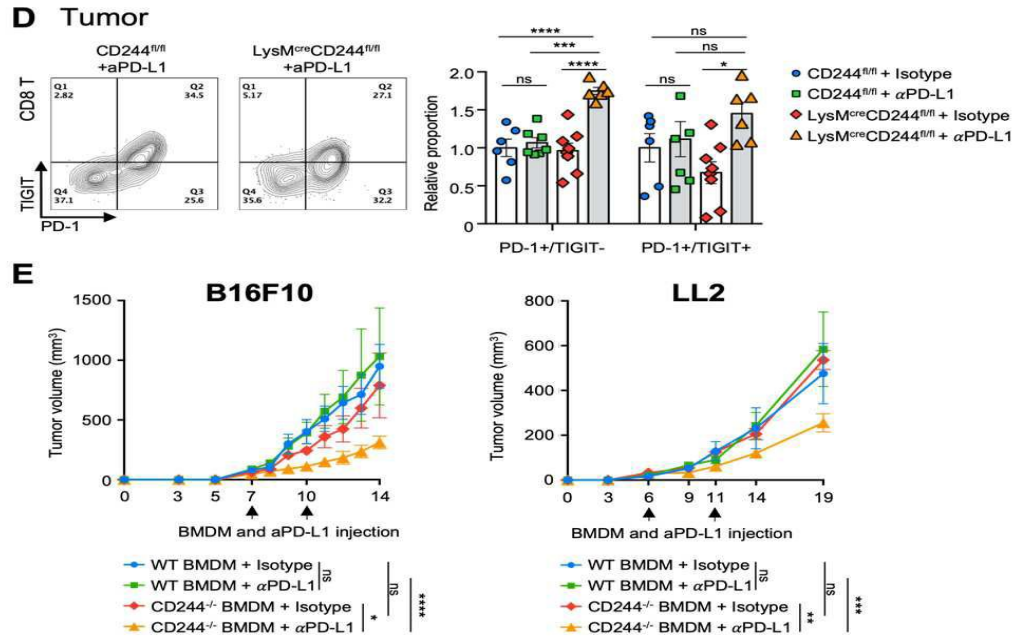
도면7a



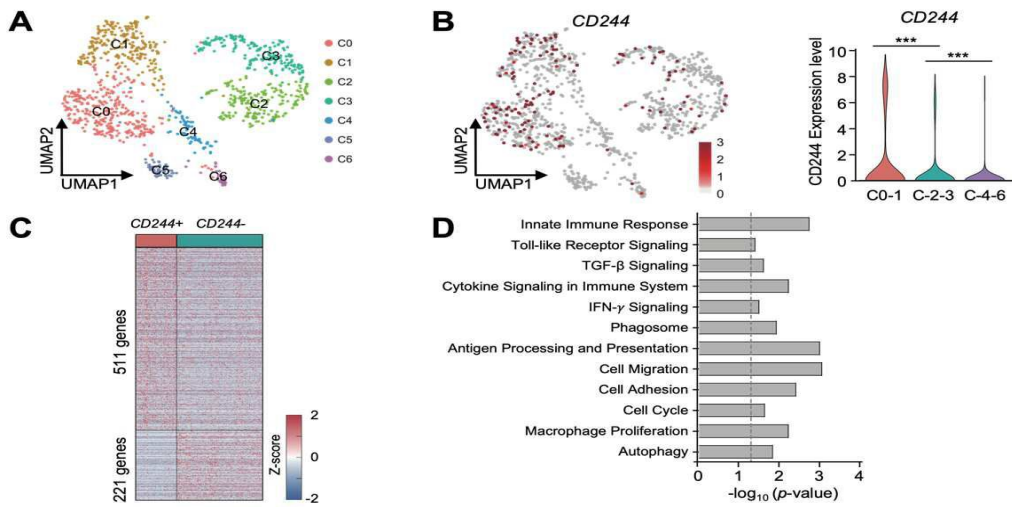
도면7b



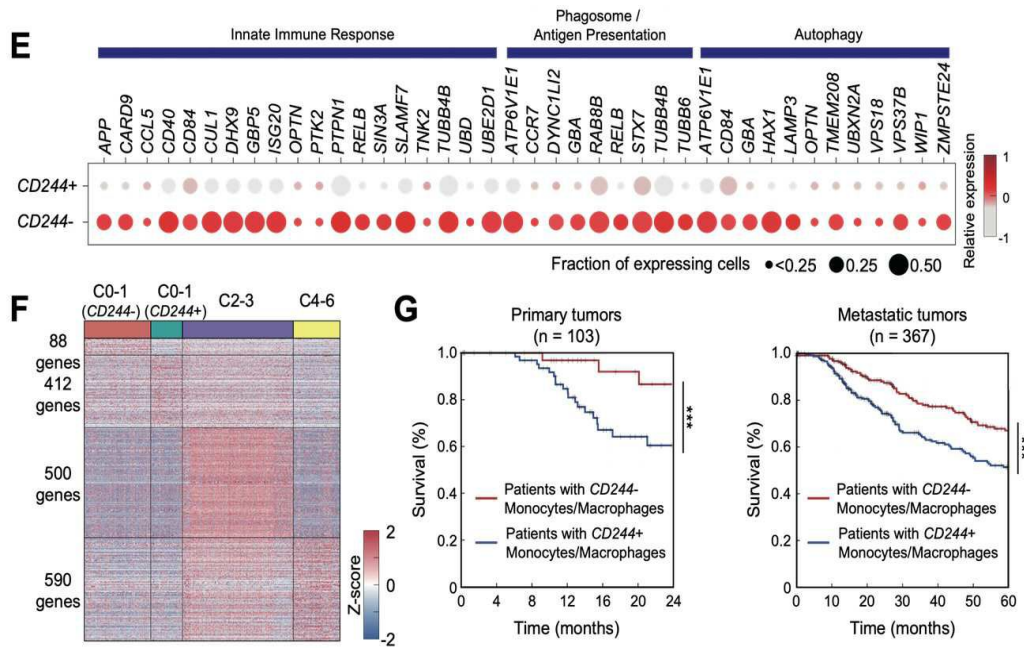
도면7c



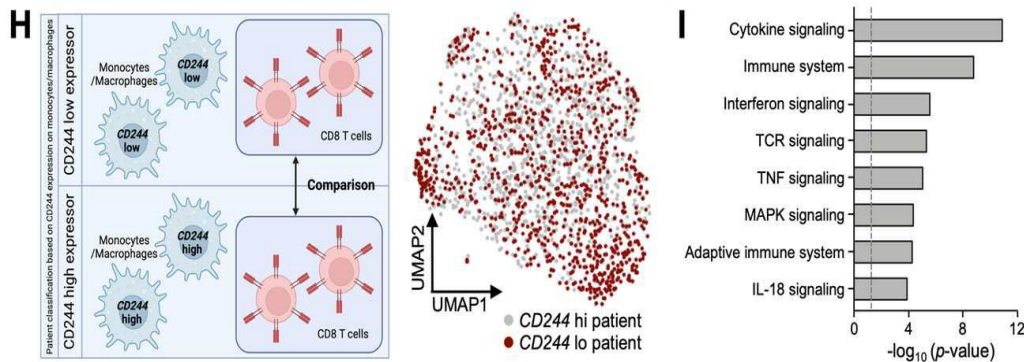
도면8a



도면8b

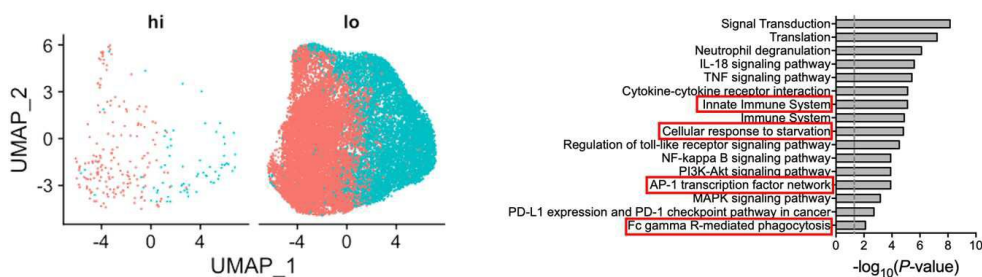


도면8c



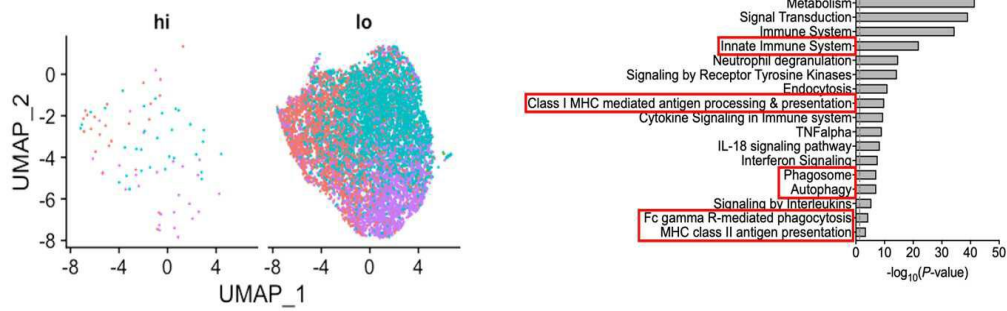
도면9a

A CRC (SCP1162)



도면9b

B Lung (GSE127465)



도면9c

C GBM (GSE131928)

