



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0082039
(43) 공개일자 2025년06월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 39/395 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01) C12Q 1/6886 (2018.01)

(52) CPC특허분류

A61K 39/3955 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0168343

(22) 출원일자 2023년11월28일

심사청구일자 2023년11월28일

(71) 출원인

한국생명공학연구원

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

재단법인 의약바이오컨버전스연구단

인천광역시 연수구 송도과학로 85, 4층(송도동,
연세대학교 국제캠퍼스 포스코그린빌딩)

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이
화여자대학교)

(72) 발명자

김태돈

대전광역시 유성구 과학로 125

안영하

대전광역시 유성구 과학로 125

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인태평양

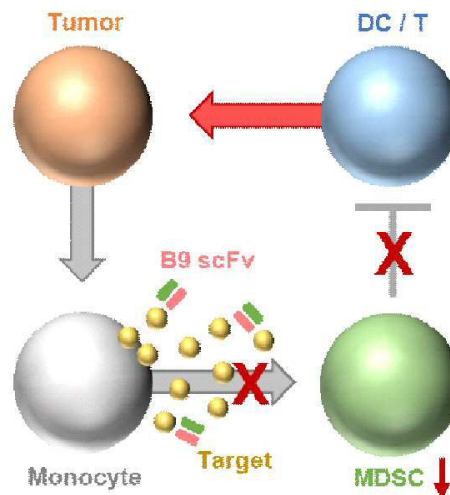
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 WRS 억제제를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 WRS(Tryptophanyl-tRNA synthetase) 억제제를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 이의 응용에 관한 것이다. 상기 WRS는 암 세포에 의해 분비되어 MDSC(myeloid-derived suppressor cells)의 분화를 유도 또는 촉진함으로써 면역 세포들의 항암 면역을 저해할 수 있는바, 상기 WRS 억제제는 WRS의 발현 또는 활성을 억제하여 MDSC의 분화를 억제함으로써, 암 세포의 증식을 효과적으로 억제할 수 있다. 따라서, 본 발명은 효과적인 항암제로 유용하게 활용될 수 있고, 나아가 WRS의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 항암제로 스크리닝하는 방법으로도 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도16



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 16/40 (2013.01)

C12Q 1/6886 (2022.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C12Q 2600/136 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

(72) 발명자

김성훈

경기도 수원시 영통구 광교로 145, 차세대융합기술
연구원내 B동 8층

심현보

서울특별시 서대문구 이화여대길 52, 이화여자대학
교

오세찬

대전광역시 유성구 과학로 125

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711123340
과제번호	CAP-18-02-KRIBB
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	국가과학기술연구회
연구사업명	국가과학기술연구회연구운영비지원(R&D)(주요사업비)
연구과제명	미래형 유전자편집 항암면역세포치료제 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	한국생명공학연구원
연구기간	2020.09.17 ~ 2021.09.16

명세서

청구범위

청구항 1

WRS(Tryptophanyl-tRNA synthetase) 억제제를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 WRS 억제제는 WRS 유전자에 상보적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNA 및 miRNA로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 약학적 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 WRS 억제제는 WRS 단백질에 특이적으로 결합하는 저분자 화합물, 앵타머 및 항체로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 약학적 조성물.

청구항 4

청구항 3에 있어서,

상기 항체는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 중쇄가변영역 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 경쇄가변영역을 포함하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 WRS 억제제는 MDSC(myeloid-derived suppressor cells)의 분화를 억제하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 6

청구항 1 내지 청구항 5 중 어느 한 항에 있어서,

상기 WRS는 mini-WRS 또는 T1-WRS인 것인, 약학적 조성물.

청구항 7

청구항 1에 있어서,

상기 암은 위암, 대장암, 췌장암, 간암, 자궁경부암, 유방암, 난소암, 두경부암, 백혈병, 카르시노이드, 전립선암, 폐암, 방광암, 자궁내막암, 흑색종, 신장암, 고환암, 신경교종, 갑상선암, 피부암 및 림프종으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 약학적 조성물.

청구항 8

청구항 1에 있어서,

상기 암은 폐암, 유방암 및 난소암으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 약학적 조성물.

청구항 9

WRS(Tryptophanyl-tRNA synthetase) 억제제를 포함하는 항암 보조제.

청구항 10

청구항 9에 있어서,

상기 WRS는 mini-WRS 또는 T1-WRS인 것인, 항암 보조제

청구항 11

WRS(Tryptophanyl-tRNA synthetase)를 발현하는 세포에 후보 물질을 처리하는 단계;

상기 후보 물질이 처리된 세포에서 상기 WRS의 발현 수준 또는 활성 수준을 측정하는 단계; 및

상기 WRS의 발현 수준 또는 활성 수준이 후보 물질이 처리되지 않은 대조군에 비해 감소하는 경우, 상기 후보 물질을 항암제로 판정하는 단계;를 포함하는 항암제의 스크리닝 방법.

청구항 12

청구항 11에 있어서,

상기 WRS는 mini-WRS 또는 T1-WRS인 것인, 항암제의 스크리닝 방법.

발명의 설명**기술 분야**

[0001] 본 발명은 WRS 억제제를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물 및 이의 응용에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 암이란 개체의 필요에 따라 규칙적이고 절제 있는 증식과 억제를 할 수 있는 정상 세포와 달리 조직 내에서 필요한 상태를 무시하고 무제한의 증식을 하는 미분화 세포로 구성된 세포덩어리로서 종양이라고도 한다. 이러한 무제한의 증식을 하는 암 세포는 주위의 조직으로 침투하고 더 심각한 경우는 신체의 다른 기관으로 전이가 되어 심각한 고통을 수반하고 결국 죽음을 초래할 수 있다. 암은 세계적으로 높은 사망률을 보이고 있고, 특히 인구의 고령화, 고지방식 섭취의 일반화, 환경 오염 물질의 급격한 증가, 음주량의 증가 등으로 대장암, 유방암, 전립선암 등 다양한 암의 발병이 지속적으로 증가하는 추세에 있다. 이러한 실정에서 암의 조기 예방 및 치료를 가능하게 하여 인간 건강의 증진, 건강한 삶의 질 향상 및 인류 보건 증진에 기여할 수 있는 항암 물질의 창출이 절실히 요구되고 있다.

[0004] 한편, 암은 크게 혈액암과 고형암으로 분류될 수 있고, 위암, 췌장암, 유방암, 구강암, 간암, 자궁암, 식도암, 피부암 등 신체의 거의 모든 부위에서 발생할 수 있다. 암의 치료방법으로 최근 글리벡 또는 허셉틴과 같은 소수의 표적 치료제가 특정 암의 치료에 이용되고 있으나 현재까지는 수술이나 방사선 요법 및 세포 증식을 억제하는 화학요법제를 이용한 항암제 치료가 주로 수행되고 있다. 그러나, 기존 화학요법제의 가장 큰 문제는 표적 치료제가 아님에 따라 세포독성으로 인한 부작용과 약제 내성이 발생하는 것으로, 항암제에 의한 초기의 성공적

인 반응에도 불구하고 결국에는 치료가 실패하게 되는 주요 요인이다. 따라서, 이러한 화학요법제의 한계를 극복하기 위해서는 항암작용 기전이 명확한 표적 치료제의 개발이 지속적으로 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명은 암을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0007] 또한, 본 발명은 항암 보조제를 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0008] 아울러, 본 발명은 신규의 항암제를 스크리닝하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 측면은 WRS(Tryptophanyl-tRNA synthetase) 억제제를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0010] 또한, 본 발명의 다른 측면은 WRS(Tryptophanyl-tRNA synthetase) 억제제를 포함하는 항암 보조제를 제공한다.
- [0011] 아울러, 본 발명의 또 다른 측면은 WRS(Tryptophanyl-tRNA synthetase)를 발현하는 세포에 후보 물질을 처리하는 단계; 상기 후보 물질이 처리된 세포에서 상기 WRS의 발현 수준 또는 활성 수준을 측정하는 단계; 및 상기 WRS의 발현 수준 또는 활성 수준이 후보 물질이 처리되지 않은 대조군에 비해 감소하는 경우, 상기 후보 물질을 항암제로 판정하는 단계;를 포함하는 항암제의 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0012] 본 발명의 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 이의 응용에 있어서 표적이 되는 WRS(Tryptophanyl-tRNA synthetase)는 암 세포에 의해 분비되어 MDSC(myeloid-derived suppressor cells)의 분화를 유도 또는 촉진함으로써 면역 세포들의 항암 면역을 저해할 수 있는 활성을 가지는데, 상기 WRS 억제제를 유효성분으로 이용하는 본 발명의 경우 WRS의 발현 또는 활성을 억제하여, MDSC의 분화를 억제함으로써 암 세포의 증식을 효과적으로 억제할 수 있는 효과가 있다. 따라서, 본 발명은 효과적인 항암제 및 항암 보조제로 유용하게 활용될 수 있고, 나아가 WRS의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 항암제로 스크리닝하는 방법으로도 유용하게 활용될 수 있다.
- [0013] 다만, 본 발명의 효과는 상기에서 언급한 효과로 제한되지 아니하며, 언급되지 않은 또 다른 효과들은 하기의 기재로부터 당업자에게 명확히 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0015] 도 1은 인간 단핵구를 정상 세포주 또는 암 세포주와 공동 배양한 후, WRS 발현 수준을 측정한 결과를 나타낸다.
- 도 2는 인간 단핵구를 난소암 세포주 SKOV3와 공동 배양한 후, 세포 용해물(WCL) 및 상층액(SUP)에서 WRS 발현 수준을 측정한 결과를 나타낸다.
- 도 3은 인간 면역세포를 난소암 세포주 SKOV3와 공동 배양한 후, WRS 발현 수준을 측정한 결과를 나타낸다.
- 도 4a는 암 세포주 YAC-1을 마우스 복강 내에 주사한 후, 복강 내 세포(PEC) 및 복강액(PCL)에서의 단기간 WRS 발현을 웨스턴 블랏 및 ELISA를 이용하여 측정한 결과를 나타낸다.
- 도 4b는 암 세포주 YAC-1을 마우스 복강 내에 주사한 후, 복강 내 세포(PEC) 및 복강액(PCL)에서의 장기간 WRS 발현을 웨스턴 블랏 및 RT-qPCR을 이용하여 측정한 결과를 나타낸다.
- 도 5는 암 세포주 YAC-1을 마우스 복강 내에 주사한 후, MDSC 분화 수준을 측정한 결과를 나타낸다.
- 도 6은 WRS 또는 이의 단편들을 마우스 복강 내에 주사한 후, MDSC 분화 수준을 측정한 결과를 나타낸다.
- 도 7은 암 세포주 YAC-1와 전장(full-length) WRS 또는 mini-WRS를 함께 마우스 복강 내에 주사한 후, MDSC 분

화 수준을 유세포 분석으로 측정한 결과를 나타낸다.

도 8a는 인간 제대혈의 CD34⁺ 조혈모줄기세포(HSC)에 hGM-CSF를 처리하여 MDSC로 분화시키면서, WRS 또는 이의 단편들을 처리한 후 MDSC 분화 수준을 측정한 결과를 나타낸다.

도 8b는 마우스 골수의 조혈모줄기세포에 mGM-CSF를 처리하여 MDSC로 분화시키면서, WRS 또는 이의 단편들을 처리한 후 MDSC 분화 수준을 측정한 결과를 나타낸다.

도 9는 마우스 피하에 암 세포주 4T1을 이식하여 고형암을 형성시키고, 암 결절 내로 mini-WRS를 주사한 후 종양 부피 및 MDSC 분화 수준을 측정한 결과를 나타낸다.

도 10은 암 세포주 YAC-1와 전장(full-length) WRS 또는 mini-WRS를 함께 마우스 복강 내에 주사한 후, T 세포 분화 수준을 유세포 분석으로 측정한 결과를 나타낸다.

도 11은 항원으로 gag를 발현하는 FBL 세포주와 TCR-gag 형질전환 마우스의 비장세포(splenocyte)를 공동 배양하여 항원 특이적 T 세포를 증식시키면서, 전장(full-length) WRS 또는 mini-WRS를 처리한 후 T 세포 분화 및 증식 정도를 측정한 결과를 나타낸다.

도 12는 WRS 및 이의 단편들의 LILRB 수용체에 대한 결합도와, 단핵구 세포주 U937에서 LILRB1 및 LILRB2의 발현을 억제한 후, mini-WRS의 세포에 대한 결합력을 측정한 결과를 나타낸다.

도 13a는 WRS 및 이의 단편들에 대한 항체의 모식도를 나타낸다.

도 13b는 WRS 및 이의 단편들에 대한 항체의 WRS 및 이의 단편들에 대한 결합도를 웨스턴 블랏으로 분석한 결과를 나타낸다.

도 13c는 WRS 및 이의 단편들에 대한 항체의 WRS 및 이의 단편들에 대한 결합도를 SPR 분석으로 측정한 결과를 나타낸다.

도 14는 마우스 피하에 암 세포주 4T1을 이식하여 고형암을 형성시키고, 암 결절 내로 WRS 항체를 주사한 후, 종양 부피를 측정한 결과를 나타낸다.

도 15는 WRS 또는 이의 단편들, 또는 이들에 대한 항체를 처리한 후, 비장, 골수 및 혈액 내에서 MDSC 분화 수준을 측정한 결과를 나타낸다.

도 16은 WRS 억제를 통해 MDSC 분화를 억제할 수 있고, 이를 통해 면역세포가 활성화되어 종양 세포를 억제할 수 있는 기전의 모식도를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

1. 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

본 발명의 일 측면은 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

또한, 본 발명의 다른 측면은 항암 보조제를 제공한다.

본 발명의 상기 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 또는 항암 보조제는 WRS(Tryptophanyl-tRNA synthetase) 억제제를 유효성분으로 포함한다.

상기 "WRS"는 단백질 번역 과정에서 아미노아실화(aminoacylation)를 통해 트립토판을 tRNA에 결합하는 기능을 수행하는 필수 효소로서, IFN γ 에 의해 발현이 유도되어 박테리아 또는 바이러스 감염에 대한 반응으로 면역세포에서 분비되며, 패혈증, 자가면역질환 및 뇌 질환을 포함하는 여러 질환에서 생리병리학적 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다.

한편, 진핵 생물의 WRS는 RF(rossmann fold) 영역, ABD(anticodon binding domain) 영역 및 ESE(eukaryotic-specific extension) 영역이 유전적으로 보존되어 있고, 전장(full-length) WRS(서열번호 3)는 WHEP 도메인으로 알려진 VES(vertebrate-specific extension) 영역을 가져 총 471 개의 아미노산으로 이루어져 있다. 상기 전장 WRS는 전사 과정에서 스플라이싱(splicing)되거나 프로테아제(protease)에 의해 절단(truncation)되어

mini-WRS, T1-WRS 및 T2-WRS와 같은 단편들을 형성할 수 있다. 전장 WRS를 기준으로, 상기 mini-WRS(서열번호 4)는 48 내지 471의 총 424 개의 아미노산으로 이루어져 있고, 상기 T1-WRS(서열번호 5)는 71 내지 471의 총 401 개의 아미노산으로 이루어져 있으며, 상기 T2-WRS(서열번호 6)는 94 내지 471의 총 378 개의 아미노산으로 이루어져 있다.

[0024] 본 발명에서 상기 WRS는 전장(full-length) WRS 뿐만 아니라, 전장 WRS가 전사 과정에서 스플라이싱(splicing)되거나 프로테아제(protease)에 의해 절단(truncation)되어 생성된 단편들을 포함할 수 있다. 상기 WRS 단편들은 구체적으로, mini-WRS, T1-WRS 및 T2-WRS일 수 있고, 보다 구체적으로, mini-WRS 및 T1-WRS일 수 있다.

[0025] 본 발명에서 WRS 억제제는 WRS의 발현 또는 활성을 감소시키는 제제를 모두 통칭하는 의미로 사용되며, 구체적으로는 WRS의 발현 감소에 영향을 주거나 WRS에 직접적으로 작용하거나 그의 리간드에 간접적으로 작용하는 등의 방식으로, WRS의 발현량을 전사(transcription), mRNA 수준, 또는 번역(translation) 수준에서 감소시키는 발현 억제제와, WRS 단백질 또는 WRS에 결합하는 리간드에 직접적으로 결합하여 활성을 방해함으로써, WRS의 활성을 감소시키는 활성 억제제를 모두 포함할 수 있다. 또한, 상기 WRS의 억제는 유전자 교정 수단(예를 들어, CRISPR/Cas9 시스템)에 의해 WRS 유전자의 일부 또는 전부를 변이, 치환 또는 삭제시키거나, 상기 WRS 유전자에 하나 이상의 염기를 삽입함으로써 이루어질 수도 있다.

[0026] 예컨대, 상기 WRS 발현 억제제는 WRS 유전자에 상보적으로 결합하는 것일 수 있고, 구체적으로 상기 WRS 발현 억제제는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNA, miRNA 등일 수 있다.

[0027] 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 특정 mRNA의 서열에 상보적인 핵산 서열을 함유하고 있는 DNA, RNA 또는 이들의 유도체로서, mRNA 내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 작용을 수행한다. 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 서열은 상기 WRS mRNA에 상보적이고 상기 mRNA에 결합할 수 있는 DNA 또는 RNA 서열을 의미한다. 이는 상기 WRS mRNA의 번역, 세포질 내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해할 수 있다. 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 통상의 방법으로 시험관 내에서 합성되어 생체 내로 투여하거나 생체 내에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 합성되도록 할 수 있다. 시험관 내에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 합성하는 한 가지 예는 RNA 중합효소 I을 이용하는 것이다. 생체 내에서 안티센스 RNA가 합성되도록 하는 한 가지 예는 다중클로닝부위(MCS)의 기원이 반대 방향에 있는 벡터를 사용하여 안티센스 RNA가 전사되도록 하는 것이다. 상기 안티센스 RNA는 서열 내에 번역 중지 코돈이 존재하도록 하여 펩타이드 서열로 번역되지 않도록 하는 것이 바람직하다. 본 발명에서 이용될 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 설계는 WRS의 염기서열을 참조하여 당업계에 공지된 방법에 따라 제작할 수 있다.

[0028] 상기 siRNA 및 shRNA는 RNA 간섭(RNAi, RNA interference) 또는 유전자 침묵(silencing)을 매개할 수 있는 핵산 분자로서, 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운(knock down) 방법 또는 유전자 치료 방법으로 사용된다. 상기 shRNA는 단일 가닥의 올리고뉴클레오타이드 내에서 상보적인 서열간의 결합에 의해 헤어핀(hairpin) 구조를 형성한 것으로, 생체 내에서 상기 shRNA는 다이스어(dicer)에 의해 절단되면서 21 내지 25 뉴클레오타이드 크기의 작은 RNA 조각으로 이중 가닥의 올리고뉴클레오타이드인 siRNA가 되며, 상보적인 서열을 갖는 mRNA에 특이적으로 결합하여 발현을 억제할 수 있다. 따라서 shRNA 및 siRNA 중 어느 수단을 이용할지는 당업자의 선택에 의해 결정될 수 있으며 이들이 표적으로 하는 mRNA 서열이 동일한 경우라면 유사한 발현 감소 효과를 기대할 수 있다. 본 발명의 목적상 WRS에 특이적으로 작용하여 WRS mRNA 분자를 절단하여 RNA 간섭을 유도함으로써, 상기 WRS를 억제할 수 있다. 상기 siRNA는 화학적으로 또는 효소학적으로 합성될 수 있고, siRNA의 제조방법으로는 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 공지된 방법을 사용할 수 있다. 예를 들면, siRNA를 직접 화학적으로 합성하는 방법, 시험관 내(in vitro) 전사를 이용한 siRNA의 합성법, 시험관 내(in vitro) 전사에 의해 합성된 긴 이중 가닥 RNA를 효소를 이용하여 절단하는 방법, shRNA 발현 플라스미드나 바이러스성 벡터의 세포 내 전달을 통한 발현법 및 PCR (polymerase chain reaction) 유도 siRNA 발현 카세트(cassette)의 세포 내 전달을 통한 발현법 등이 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0029] 상기 miRNA는 표적 유전자의 전사 후 발현을 조절하는, 일반적으로 약 15 내지 약 50 뉴클레오타이드 길이, 바람직하게는 17 내지 23 뉴클레오타이드 길이의 작은 비-암호화 RNA 분자를 의미한다. 상기 miRNA의 생물발생은 세포 핵 및 세포질에서 발생하는 다단계의 과정에 의해 이루어질 수 있다. 성숙한 miRNA는 RNA-유도된 침묵화 복합체에 통합되어 mRNA의 3' 말단의 비번역 영역(UTR)에 결합할 수 있고, 이는 mRNA 분해 또는 번역 억제를 유도할 수 있다. 상기 miRNA는 세포 내에서 RNase III 효소에 의한 연속 절단을 통해 1차 전사물(pri-miRNA)로부터 유래되는 약 70 개 이상 뉴클레오타이드의 헤어핀 전구체(pre-miRNA)로부터 가공될 수 있다.

- [0030] 본 발명에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNA 또는 miRNA와 같은 핵산 물질을 세포 내로 전달하는 효율을 높이기 위하여, 안전하고 효율적인 전달 시스템을 이용할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNA 또는 miRNA는 핵산 전달체(nucleic acid delivery system)와 함께 조성물 내에 포함될 수 있다. 본 발명에서 상기 핵산 전달체는 크게 바이러스성 벡터와 비바이러스성 벡터로 구분할 수 있다. 가장 널리 이용되는 것은 바이러스 벡터(viral vector)로 전달 효율이 높고 지속 시간이 길다는 이점이 있다. 여러 바이러스 벡터 중 레트로바이러스 벡터(retroviral vector), 아데노바이러스 벡터(adenoviral vector), 아데노 부속 바이러스 벡터(adenovirus-associated viral vector) 등이 주요하게 사용되고 있다. 비바이러스 벡터(nonviral vector)는 독성과 면역 반응이 적고, 반복적으로 투여가 가능하며, 리보핵산과의 복합체 형성이 간편하고, 대량 생산이 용이한 이점이 있다. 또한, 질환 세포나 조직부위에 특이적 리간드를 비바이러스성 벡터에 접합하여, 장기세포 선택적 핵산 전달을 가능하게 하는 이점이 있다. 비바이러스성 벡터로서는 리포솜, 양이온성 고분자를 비롯하여, 미셀, 에멀전, 나노입자 등의 다양한 제형이 사용될 수 있다. 상기 핵산 전달체는 동물 세포 내에 목적하는 핵산의 수송 효율을 현저히 증강시킬 수 있으며 전달하고자 하는 핵산의 사용 목적에 따라 어떤 동물 세포로도 핵산 전달이 가능하다.
- [0031] 또한, 상기 WRS 활성 억제제는 WRS 단백질에 특이적으로 결합하는 것일 수 있고, 예컨대 상기 WRS 활성 억제제는 저분자 화합물, 앵타머, 항체 등일 수 있다.
- [0032] 상기 저분자 화합물(small molecule)은 분자량이 1000 Da 이하인 유기 화합물로, 생물학적 과정에서 조절자로 작용하는 경우가 많으며, 단백질이나 핵산과 같은 생체고분자에 결합하여 생체고분자의 기능을 조절하는 분자를 의미한다. 상기 저분자 화합물은 단백질의 기능을 저해하거나 단백질-단백질 상호작용을 방해하기도 하며, 인공적으로 합성될 수 있다. 본 발명에서 상기 저분자 화합물은 WRS 또는 WRS의 리간드 단백질과 결합하여 WRS의 활성을 억제할 수 있는 것일 수 있다.
- [0033] 상기 앵타머(aptamer)는 단일가닥 올리고뉴클레오타이드로서, 20 내지 60 뉴클레오타이드 정도의 크기이며, 소정의 표적 분자에 대한 결합 활성을 갖는 핵산 분자를 의미한다. 상기 앵타머는 서열에 따라 다양한 3 차원 구조를 가지며, 항원-항체 반응처럼 특정 물질과 높은 친화력을 가질 수 있고, 소정의 표적 분자에 대하여 결합함으로써, 소정의 표적 분자의 활성을 저해할 수 있다. 상기 앵타머는 RNA, DNA, 변형된(modified) 핵산 또는 이들의 혼합물일 수 있으며, 또한 직쇄상 또는 환상의 형태일 수 있다. 본 발명에서 상기 앵타머는 WRS에 결합하여 WRS의 활성을 저해하는 역할을 할 수 있으며, WRS의 서열로부터 당업자가 공지의 방법에 의해 제조할 수 있다.
- [0034] 상기 항체는 생체의 면역계에서 혈액이나 림프를 순환하면서 외부 물질인 항원이 침입한 경우 이에 반응하는 물질을 의미하며, 림프조직에서 형성되는 글로불린계 단백질로 면역글로불린이라고도 지칭된다. 항체는 B 세포가 생산해서 체액으로 흘러보내는 단백질로 항원과 특이적으로 결합하며, 하나의 항체 분자에는 두 개의 중쇄(heavy chain)와 두 개의 경쇄(light chain)가 존재하고, 각각의 중쇄와 경쇄는 그의 N-터미널 말단에 가변영역을 갖고 있다. 각각의 가변영역은 3 개의 상보성 결정부위(Complementarity determining region: CDR)와 4 개의 구조 형성부위 (framework regions: FRs)로 구성되는데, 상보성 결정 부위들은 항체의 항원 결합 특이성을 결정하고, 가변영역의 구조형성 부위들로 유지되는 비교적 짧은 펩티드 서열로 존재한다.
- [0035] 본 발명에서 상기 항체는 WRS 단백질에 특이적이고 직접적으로 결합하여 WRS 단백질의 활성을 효과적으로 억제할 수 있다. 상기 WRS에 특이적으로 결합하는 항체는 당업자에게 알려진 공지의 방법으로 제작하여도 무방하며, 예를 들어 면역원인 WRS 단백질을 외부 숙주에 주사함으로써 제조될 수 있다. 외부 숙주는 마우스, 래트, 양, 토끼와 같은 포유동물을 포함하며, 면역원은 근내, 복강내 또는 피하 주사방법으로 주사될 수 있고, 일반적으로 항원성을 증가시키기 위한 보조제(adjuvant)와 함께 투여할 수 있다. 외부 숙주로부터 정기적으로 혈액을 채취하여 항원에 대한 특이성을 보이는 혈청을 수거하여 항체를 분리할 수 있다.
- [0036] 구체적으로, 본 발명에서 WRS에 대한 항체는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 중쇄가변영역 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 경쇄가변영역을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0037] 또한, 상기 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열은 각각 상기 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열과 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드 및 이의 변이체 또는 이의 활성 단편을 포함한다. 상기 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드란 상기 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열과 각각 약 70% 이상, 약 75% 이상, 약 80% 이상, 약 85% 이상, 약 90% 이상, 약 92% 이상, 약 95% 이상, 약 97% 이상, 약 98% 이상, 또는 약 99% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 의미한다.

- [0038] 한편, 본 발명에서 상기 WRS 억제제는 MDSC(myeloid-derived suppressor cells)의 분화를 억제하는 것일 수 있다.
- [0039] 상기 MDSC(myeloid-derived suppressor cells)는 암에 의해 분화가 유도되어, 면역세포들의 항암 면역을 저해함으로써 암 세포의 증식을 촉진하는 것으로 알려져 있다.
- [0040] 본 발명에서 상기 WRS 억제제는 MDSC의 분화를 억제함으로써, 암 세포의 증식을 억제할 수 있고, 따라서 암의 예방 또는 치료와 항암 보조제로서 유용하게 활용될 수 있다.
- [0041] 본 발명의 구체적인 실시예에서, WRS 및 이의 단편들은 MDSC의 분화 및 암 세포의 성장을 촉진하는 반면, WRS 억제제로서 WRS 및 이의 단편들에 대한 표적 항체들은 MDSC의 분화 및 암 세포의 성장을 효과적으로 억제하는 것으로 나타나, 본 발명의 WRS 억제제가 암의 예방 또는 치료와 항암 보조제로서 유용하게 활용될 수 있음을 확인하였다.
- [0042] 상기 "암"은 의학적으로 세포의 정상적인 분열, 분화 또는 사멸의 조절 기능에 문제가 발생하여, 비정상적으로 과다 증식하고 주위 조직 또는 장기에 침윤하여 덩어리를 형성함으로써 기존의 구조를 파괴하거나 변형시키는 모든 상태를 의미한다.
- [0043] 본 발명에서 상기 암은 의학적으로 암의 범주에 해당하는 한, 모두 포함할 수 있으며 구체적인 질환명이 특별히 제한되지 않으나, 구체적으로 상기 암은 위암, 대장암, 결장암, 직장암, 식도암, 췌장암, 간암, 자궁경부암, 유방암, 난소암, 두경부암, 골암, 백혈병, 카르시노이드, 전립선암, 폐암, 방광암, 자궁내막암, 흑색종, 신장암, 고환암, 신경교종, 갑상선암, 피부암 및 림프종으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있고, 보다 구체적으로 폐암, 유방암 및 난소암으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다. 또한, 본 발명에서 상기 암에 의해 MDSC의 분화가 촉진될 수 있고, 상기 MDSC의 과분화(hyperdifferentiation)로 인해 암의 증식이 더욱 촉진될 수 있다.
- [0044] 한편, 본 발명에서 "예방"이란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 암을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미하며, "치료"란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 암에 대한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0045] 또한, 본 발명에서 "투여"는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 다양한 방법 및 전달 시스템 중 임의의 것을 사용하여 본 발명에 따른 약학적 조성물을 개체에게 물리적으로 도입하는 것을 의미하고, 본 발명에서 "개체"란 암의 예방 또는 치료를 필요로 하는 대상을 의미하는 것으로, 구체적으로, 인간 또는 영장류, 생쥐, 쥐, 개, 고양이, 말, 돼지, 토끼 및 소 등의 포유류를 의미한다.
- [0046] 본 발명의 약학적 조성물은 유효성분을 단독으로 포함하거나, 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함하여 제공될 수 있다.
- [0047] 상기 "약학적으로 허용 가능한"의 의미는 유효성분의 활성을 억제하지 않으면서 적용(처방) 대상이 적용 가능한 이상의 독성을 지니지 않는다는 것이며, 상기 "담체"는 세포 또는 조직 내로의 화합물의 부가를 용이하게 하는 화합물을 의미한다.
- [0048] 구체적으로, 상기 담체는 예를 들어, 콜로이드 현탁액, 분말, 식염수, 지질, 리포솜, 미소구체(microspheres) 또는 나노 구형입자일 수 있다. 이들은 운반 수단과 복합체를 형성하거나 관련될 수 있고, 지질, 리포솜, 미세입자, 금, 나노입자, 폴리머, 축합 반응제, 다당류, 폴리아미노산, 텐드리머, 사포닌, 흡착 증진 물질 또는 지방산과 같은 당업계에 공지된 운반 시스템을 사용하여 생체 내 운반될 수 있다.
- [0049] 본 발명의 약학적 조성물이 제제화될 경우에는 통상적으로 사용하는 유효제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제, 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함될 수 있고, 이러한 고형제제는 상기 약학적 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 유효제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수용성제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propyleneglycol), 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에

스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기재로는 위텡솔(witepsol), 마크로콜, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로 젤라틴 등이 사용될 수 있고, 점안제 형태로 제조 시 공지의 희석제 또는 부형제 등이 사용될 수 있다.

[0050] 한편, 본 발명의 약학적 조성물은 목적 또는 필요에 따라 당업계에서 사용되는 통상적인 방법, 투여 경로, 투여량에 따라 적절하게 개체에 투여될 수 있다. 투여 경로의 예로는 경구, 비경구, 피하, 복강 내, 폐 내, 및 비강 내로 투여될 수 있으며, 비경구 주입에는 근육 내, 정맥 내, 동맥 내, 복강 내 또는 피하투여가 포함된다. 또한 당업계에 공지된 방법에 따라 적절한 투여량 및 투여 횟수가 선택될 수 있으며, 실제로 투여되는 본 발명의 약학적 조성물의 양 및 투여 횟수는 치료하고자 하는 증상의 종류, 투여 경로, 성별, 건강 상태, 식이, 개체의 연령 및 체중, 및 질환의 중증도와 같은 다양한 인자에 의해 적절하게 결정될 수 있다.

[0051] 상기 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 상기 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 용도에 적용 가능한 합리적인 비율로 질환을 억제 또는 완화하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 예를 들어, 약학적으로 유효한 양은 0.5~1000 mg /day/체중kg일 수 있고, 구체적으로 0.5~500 mg/day/체중kg일 수 있다.

[0052] 본 발명에서 상기 "항암 보조제"는 항암제의 항암 효과를 개선, 향상 또는 증대시킬 수 있는 제제를 의미한다. 상기 항암 보조제는 항암제와 동시에, 별도로, 또는 순차적으로 병용 투여되어 항암제의 항암 효과, 예를 들어 암 세포 성장 저해 효과 또는 암의 전이 억제 효과를 증진시키거나, 항암제 내성 암에 대한 항암제의 항암 효과를 증진시키거나, 항암제의 부작용을 억제 또는 개선시킬 수 있다.

[0053] 본 발명의 항암 보조제는 목적하는 바에 따라 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 경구 투여, 폐 내 투여, 직장 내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한, 상기 항암 보조제는 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[0054] 또한, 본 발명의 항암 보조제는 투여를 위해서 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제제화할 수 있다. 본 발명의 항암 보조제에 포함될 수 있는 담체, 부형제 또는 희석제로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0055] 또한, 상기 항암 보조제는 항암제의 투여 전, 또는 투여 후에 단독으로 투여될 수 있고, 항암제와 동시에 암 치료를 위한 보조제로서 함께 투여될 수 있다. 본 발명의 항암 보조제를 항암제와 함께 투여하는 경우에는 환자의 상태, 항암제의 투여량, 항암제의 투여기간 등에 따라 항암제와 적절한 비율로 함께 투여될 수 있으며, 구체적으로 항암제 총 중량에 대비하여 0.01 내지 10 배로 투여될 수 있다.

[0057] 2. 항암제 스크리닝 방법

[0058] 또한, 본 발명의 다른 측면은 WRS(Tryptophanyl-tRNA synthetase)를 발현하는 세포에 후보 물질을 처리하는 단계; 상기 후보 물질이 처리된 세포에서 상기 WRS의 발현 수준 또는 활성 수준을 측정하는 단계; 및 상기 WRS의 발현 수준 또는 활성 수준이 후보 물질이 처리되지 않은 대조군에 비해 감소하는 경우, 상기 후보 물질을 항암제로 판정하는 단계;를 포함하는 항암제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0059] 중복되는 기재는 '1. 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물'에서 전술한 바와 동일한바, 그 기재는 생략한다.

[0060] 본 발명에서 상기 후보 물질은 공지된 물질 또는 신규 물질일 수 있고, 펩티드, 단백질, 비펩티드성 화합물, 합성 화합물, 발효 생산물, 세포 추출액, 식물 추출액 및 동물 조직 추출액으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0061] 또한, 본 발명에서 상기 스크리닝 방법은 생체 내(*in vivo*) 또는 시험관 내(*in vitro*)에서 수행될 수 있으며,

특별히 제한되지 않는다.

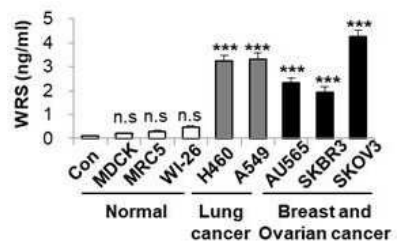
- [0062] 본 발명에서 상기 WRS의 발현 수준을 측정하는 단계는 WRS의 mRNA 발현 수준을 측정함으로써 수행될 수 있다. 상기 mRNA 발현 수준의 측정이란 항암제를 스크리닝하기 위하여 WRS의 mRNA 존재 여부 및 발현 수준을 확인하는 과정으로, mRNA의 양을 측정함으로써 수행될 수 있다. 상기 mRNA 발현 수준을 측정하는 제제로는 WRS의 mRNA에 대한 프라이머(primer) 쌍, 프로브(probe), 또는 안티센스 뉴클레오티드(anti-sense nucleotide)가 사용될 수 있고, 상기 mRNA 발현 수준의 측정은 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR(competitive RTPCR), 실시간 RT-PCR(real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting) 및 DNA 칩으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 방법으로 측정하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0063] 또한, 본 발명에서 상기 WRS의 활성 수준을 측정하는 단계는 WRS 단백질의 발현 수준을 측정함으로써 수행될 수 있다. 상기 단백질 발현 수준의 측정이란 항암제를 스크리닝하기 위하여 세포주 또는 환자로부터 채취되어 분리된 시료에서 발현된 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 상기 유전자의 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 단백질의 양을 측정함으로써 수행될 수 있다. 상기 단백질 발현 수준을 측정하는 제제로는 항체가 사용될 수 있고, 상기 단백질 발현 수준의 측정은 웨스턴 블랏팅(Western blotting), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사면역확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓트(rocket) 면역전기영동, 조직면역염색, 이중 루시페라아제 측정법(dual luciferase reporter assay), 면역침전 분석법(immunoprecipitation assay), 보체고정분석법(complement fixation assay), FACS(Fluorescence activated cell sorter) 및 단백질 칩으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 방법으로 측정하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0064] 본 발명의 스크리닝 방법은 항암제 후보 물질의 부재 하에 세포에서의 WRS 유전자의 발현 수준 또는 WRS 단백질의 발현 수준을 측정하고 또한, 상기 후보 물질의 존재 하에서 WRS의 발현 수준 또는 WRS 단백질의 발현 수준을 측정하여 양자를 비교한 후, 상기 후보 물질이 존재할 때의 WRS 유전자의 발현 수준 또는 WRS 단백질의 발현 수준이 상기 후보 물질의 부재 하에서의 발현 수준보다 감소하는 경우, 상기 후보 물질을 항암제로 판정함으로써, 항암제의 스크리닝에 유용하게 활용될 수 있다.
- [0065] 본 발명에서 상기 WRS의 발현 수준 또는 활성 수준이 후보 물질이 처리되지 않은 대조군에 비해 1% 이상, 5% 이상, 10% 이상, 15% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 30% 이상, 35% 이상, 40% 이상, 45% 이상 또는 50% 이상 감소하는 경우, 상기 후보 물질을 항암제로 유의하게 판정할 수 있다.
- [0067] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명한다.
- [0068] 단, 하기 실시예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되지 아니한다.
- [0070] **[실시예 1]**
- [0071] **암 세포에 의한 WRS 발현 효과 확인**
- [0072] WRS(Tryptophanyl-tRNA synthetase)는 단백질 번역 과정에서 아미노아실화(aminoacylation)를 통해 트립토판을 tRNA에 결합하는 기능을 수행하는 필수 효소로서, 박테리아 또는 바이러스 감염에 대한 반응으로 면역세포에서 분비되며, 전장(full-length) WRS는 mini-WRS, T1-WRS 또는 T2-WRS 단편들로 스플라이싱 되거나 절단(truncation)되는 것으로 알려져 있다. 상기 WRS가 암 세포에 의해서 발현되는지 여부를 확인하기 위하여 하기의 실험들을 수행하였다.
- [0073] 먼저, 암 세포가 인간 단핵구에서 WRS의 발현을 유도하는지 확인하기 위하여, 정상 세포주 또는 암 세포주를 인간 단핵구와 공동 배양한 후, WRS의 발현 수준을 측정하였다.
- [0074] 그 결과, 인간 단핵구를 정상 세포주(MDCK, MRC5 또는 WI-26)와 공동 배양할 경우에는 WRS 발현 수준에 유의한 변화가 나타나지 않았으나, 인간 단핵구를 폐암 세포주(H460 또는 A549), 유방암 세포주(AU565 또는 SKBR3) 또는 난소암 세포주(SKOV3)와 공동 배양할 경우에는 모두 WRS 발현 수준이 유의하게 증가하는 것으로 나타났다(도 1).

- [0075] 또한, 인간 단핵구를 난소암 세포주 SKOV3와 공동 배양한 후, 세포 용해물(WCL) 및 상층액(SUP)에서 WRS 발현을 확인한 결과, 세포 용해물 및 상층액 모두에서 WRS와 이의 단편들이 발현되는 것으로 나타났다(도 2).
- [0076] 다음으로, WRS가 어떤 면역세포에서 발현되는지 확인하기 위하여, 난소암 세포주 SKOV3를 인간 면역세포(B 세포, T 세포, 단핵구 및 NK 세포)와 공동 배양한 결과, WRS가 단핵구 특이적으로 발현되는 것으로 나타났다(도 3).
- [0077] 마지막으로, 암 세포주 YAC-1을 마우스 복강 내에 주사한 후, 복강 내 세포(PEC) 및 복강액(PCL)에서의 WRS 발현을 웨스턴 블랏, ELISA 및 RT-qPCR을 이용하여 측정된 결과, 복강 내 세포 및 복강액 모두에서 WRS와 이의 단편들이 장기간 발현되는 것으로 나타났다(도 4a 및 4b).
- [0078] 상기 실험을 통해, 암 세포가 WRS 및 이의 단편들의 발현을 유도하며, 상기 발현은 단핵구 특이적으로 이루어짐을 확인하였다.
- [0080] **[실시예 2]**
- [0081] **WRS의 MDSC 분화 및 암 세포 증식 촉진 효과 확인**
- [0082] MDSC(myeloid-derived suppressor cells)는 암에 의해 분화가 유도되어, 면역세포들의 항암 면역을 저해하는 것으로 알려져 있다. 이러한 암 세포에 의한 MDSC의 분화 유도 과정에서, WRS의 기능을 확인하기 위해 하기의 실험들을 수행하였다.
- [0083] 먼저, 암 세포주 YAC-1을 마우스 복강 내에 주사할 경우 MDSC의 분화가 유도되는 것으로 나타났으며(도 5), WRS 또는 이의 단편들을 마우스 복강 내에 주사할 경우에도 MDSC의 분화가 유도되며, WRS 단편 중 mini-WRS 및 T1-WRS가 MDSC 분화를 현저하게 촉진하는 것으로 나타났다(도 6).
- [0084] 또한, 암 세포주 YAC-1와 전장(full-length) WRS 또는 mini-WRS를 함께 마우스 복강 내에 주사한 후, MDSC 분화 정도를 유세포 분석으로 측정한 결과, mini-WRS를 처리할 경우 MDSC의 분화가 상당히 촉진되는 것으로 나타났다(도 7).
- [0085] 다음으로, 인간 제대혈의 $CD34^{+}$ 조혈모줄기세포(HSC)에 hGM-CSF를 처리하여 MDSC로 분화시키면서, WRS 또는 이의 단편들을 처리한 후 MDSC 분화 수준을 측정한 결과, mini-WRS 및 T1-WRS에 의해 MDSC 분화가 유의하게 증가함을 확인하였다(도 8a). 또한, 마우스 골수의 조혈모줄기세포에 mGM-CSF를 처리하여 MDSC로 분화시키면서 WRS 또는 이의 단편들을 처리할 경우에도, 인간 조혈모줄기세포에서와 유사하게, mini-WRS 및 T1-WRS에 의해 MDSC 분화가 유의하게 증가하는 것으로 나타났다(도 8b).
- [0086] 마지막으로, 마우스 피하에 암 세포주 4T1을 이식하여 고형암을 형성시킨 후, 암 결절 내로 mini-WRS를 주사할 경우, MDSC의 분화가 촉진될 뿐만 아니라, 종양의 부피 또한 유의하게 증가하는 것으로 나타났다(도 9).
- [0087] 상기 실험을 통해, WRS가 면역세포들의 항암 면역을 저해하는 MDSC의 분화를 촉진하고, 특히 mini-WRS 및 T1-WRS 단편이 MDSC의 분화를 현저하게 촉진할 수 있음을 확인하였으며, mini-WRS의 경우 암 세포의 증식 또한 촉진할 수 있음을 확인하였다.
- [0089] **[실시예 3]**
- [0090] **WRS의 T 세포 분화 억제 효과 확인**
- [0091] WRS가 T 세포 분화에 미치는 효과를 확인하기 위하여, 먼저 암 세포주 YAC-1와 전장(full-length) WRS 또는 mini-WRS를 함께 마우스 복강 내에 주사한 후, T 세포 분화 정도를 유세포 분석으로 측정하였다. 그 결과, 전장 WRS 처리에 의해 T 세포 분화가 억제되며, mini-WRS 처리에 의해서는 T 세포 분화가 현저하게 억제되는 것으로 나타났다(도 10).
- [0092] 추가적으로, 항원으로 gag를 발현하는 FBL 세포주와 TCR-gag 형질전환 마우스의 비장세포(splenocyte)를 공동 배양하여 항원 특이적 T 세포를 증식시키면서, 전장(full-length) WRS 또는 mini-WRS를 처리한 후 T 세포 분화 및 증식 정도를 측정하였다. 그 결과, 전장 WRS 처리에 의해 T 세포 분화 및 증식이 억제되며, mini-WRS 처리에 의해서는 T 세포 분화 및 증식이 현저하게 억제되는 것으로 나타났다(도 11).

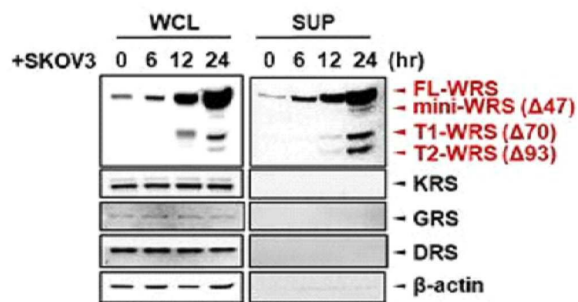
- [0093] 상기 실험을 통해, WRS가 T 세포의 분화를 억제하며, 특히 mini-WRS 단편이 T 세포의 분화 및 증식을 현저하게 억제할 수 있음을 확인하였다.
- [0095] **[실시예 4]**
- [0096] **WRS와 LILRB 수용체의 결합도 분석**
- [0097] MDSC의 분화는 LILRB2 수용체와 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 이에, WRS가 LILRB 수용체에 작용하여 MDSC의 분화를 촉진하는 것인지 확인하기 위하여 WRS 및 이의 단편들의 LILRB 수용체에 대한 결합도를 SPR 분석법을 이용하여 측정하였다.
- [0098] 그 결과, mini-WRS의 LILRB1 및 LILRB2에 대한 결합력이 전장(full-length) WRS에 비해 높게 측정되었으며, 단핵구 세포주 U937에서 LILRB1 및 LILRB2의 발현을 억제할 경우, mini-WRS의 세포에 대한 결합력이 현저하게 감소하는 것으로 나타났다(도 12).
- [0099] 상기 실험을 통해, WRS가 LILRB 수용체와 결합함으로써, MDSC의 분화를 조절할 수 있음을 확인하였다.
- [0101] **[실시예 5]**
- [0102] **WRS 표적 항체의 암 성장 억제 효과 확인**
- [0103] 상기 실시예1 내지 4에서 수행한 실험들을 통해, WRS가 MDSC의 분화를 촉진하는 한편, T 세포의 분화 및 증식은 억제함으로써 암 세포의 증식 및 종양 부피를 증가시킬 수 있음을 확인하였다. 이에, WRS의 활성을 억제할 수 있는 WRS 표적 항체를 제작한 후, 상기 항체의 암 성장 억제 효과를 확인하기 위하여 하기의 실험들을 수행하였다.
- [0104] 먼저, WRS 및 이의 단편들에 대한 항체로서 4G4, W1, B9 및 1A10을 제작하였고(도 13a), 이들의 WRS 및 이의 단편들에 대한 결합도를 웨스턴 블랏 및 SPR 분석법을 이용하여 측정하였다(도 13b 및 13c). 4G4 항체의 경우 전장(full-length) WRS에만 높은 결합도를 보여주었고, W1 항체의 경우 전장 WRS 및 mini-WRS에 높은 결합도를 보여주었다. B9 항체의 경우 전장 WRS, mini-WRS 및 T1-WRS에 높은 결합도를 보여주었고, 1A10 항체의 경우 전장 WRS, mini-WRS, T1-WRS 및 T2-WRS 모두에 대해서 높은 결합도를 보여주었다.
- [0105] 이후, 상기 항체들이 암 성장 억제 효과를 갖는지 확인하기 위하여, 마우스 피하에 암 세포주 4T1을 이식하여 고형암을 형성시키고, 암 결절 내로 WRS 항체를 주사한 후, 종양 부피를 측정하였다.
- [0106] 그 결과, 4G4 항체는 대조군에 비해 종양 부피를 유의하게 감소시키지 않았으나, W1 항체 및 B9 항체는 종양 부피를 감소시키고, B9 항체의 경우 종양 부피를 현저하게 감소시키는 것으로 나타났다(도 14).
- [0107] 또한, mini-WRS 또는 T1-WRS를 처리할 경우, 비장, 골수 및 혈액 내의 MDSC 분화 정도가 유의하게 증가하나, W1 항체 또는 B9 항체를 처리할 경우, MDSC 분화 정도가 감소하며, B9 항체의 경우 MDSC 분화 정도를 현저하게 감소시켰다(도 15).
- [0108] 상기 실험을 통해, WRS 표적 항체가 암 성장 및 MDSC 분화를 억제할 수 있으며, 특히 B9 항체가 암 성장 및 MDSC 분화를 현저하게 억제할 수 있음을 확인하였다. 따라서, 상기 WRS 표적 항체는 항암제로서 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.
- [0110] 상기에서는 본 발명의 대표적인 실시예를 예시적으로 설명하였으나, 본 발명의 범위는 상기와 같은 특정 실시예에만 한정되지 아니하며, 해당 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 본 출원의 청구범위에 기재된 범주 내에서 적절하게 변형이 가능할 것이다.

도면

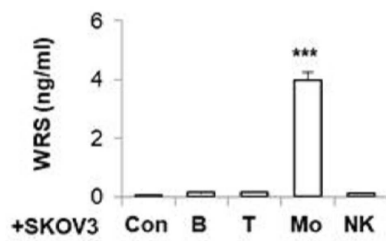
도면1



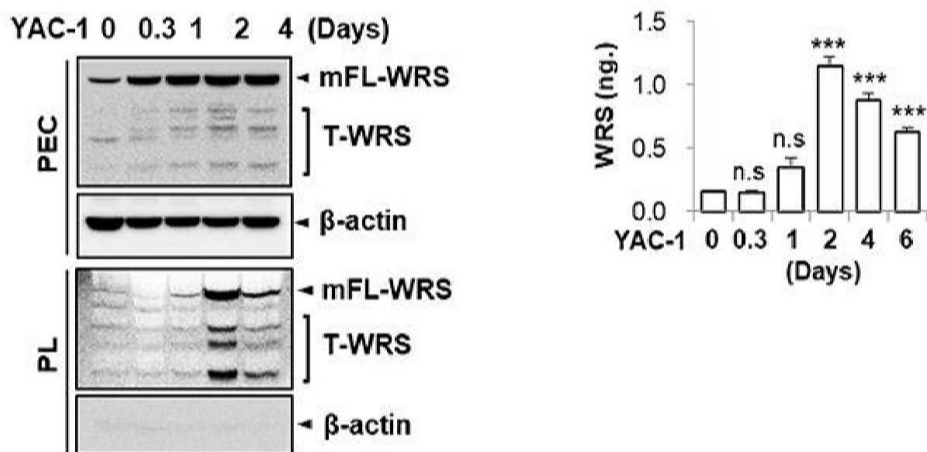
도면2



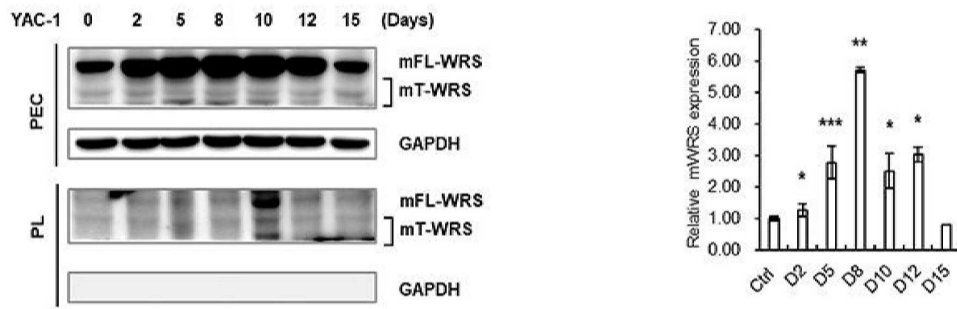
도면3



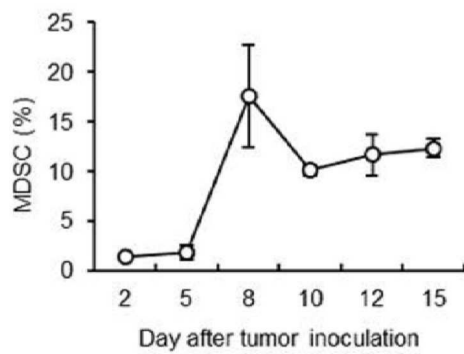
도면4a



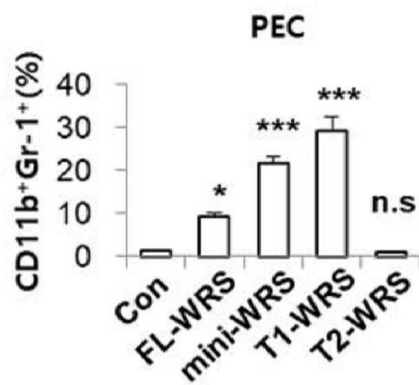
도면4b



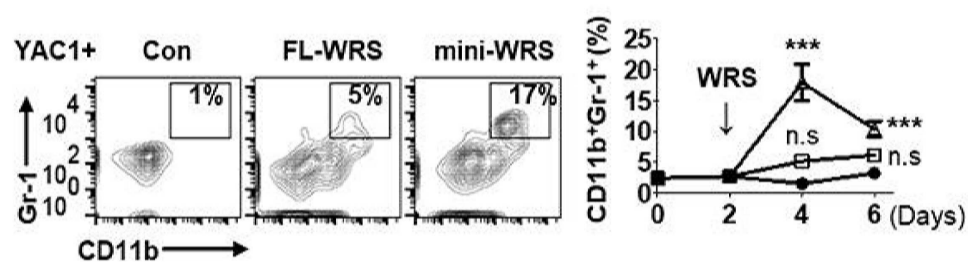
도면5



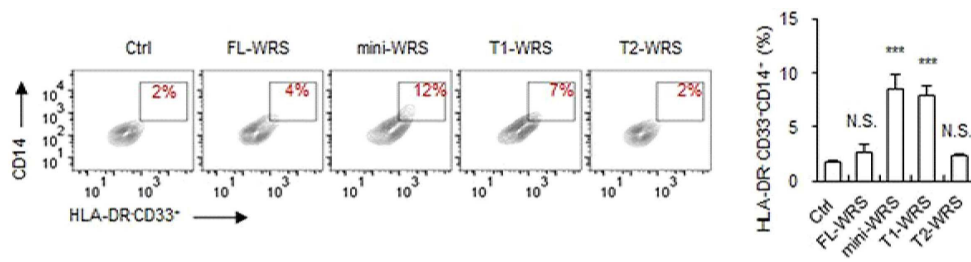
도면6



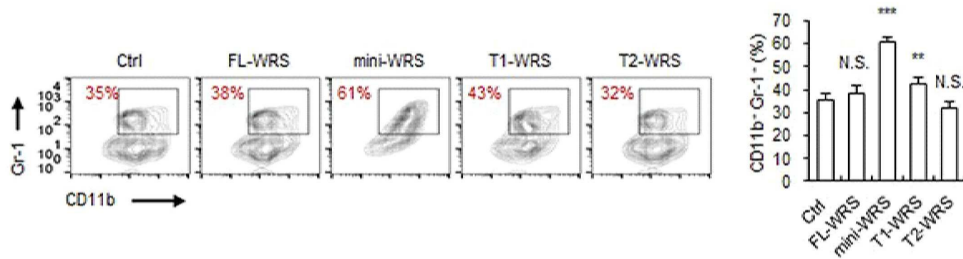
도면7



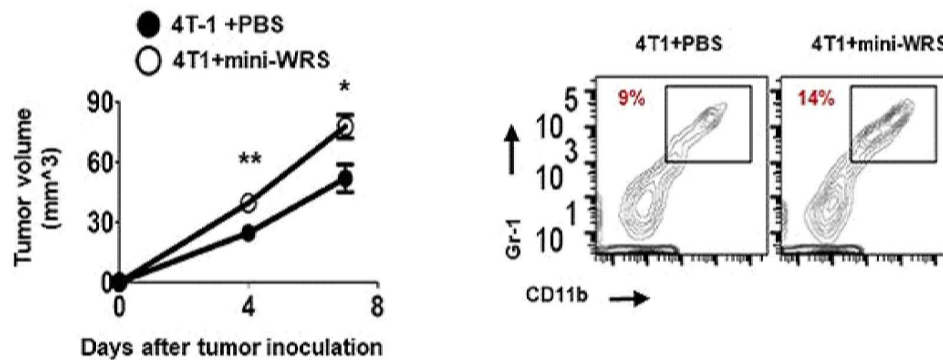
도면8a



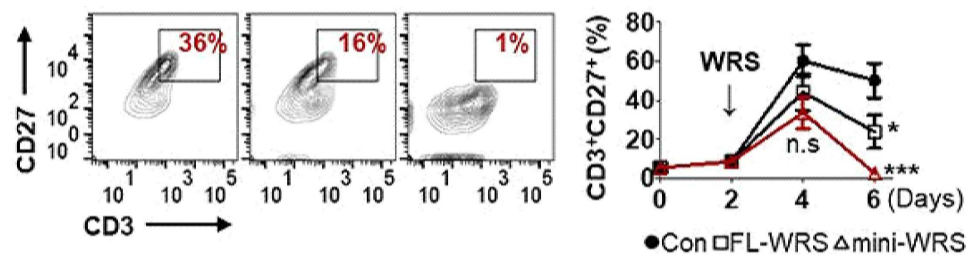
도면8b



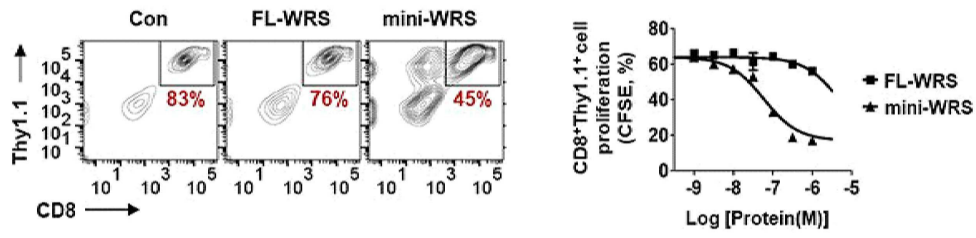
도면9



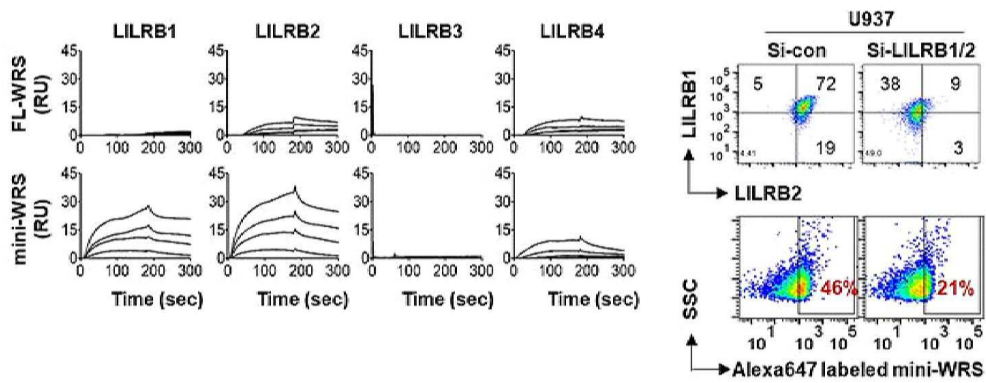
도면10



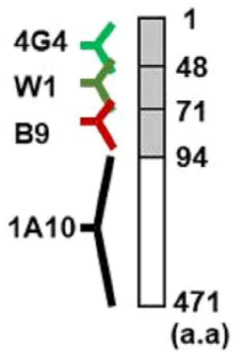
도면11



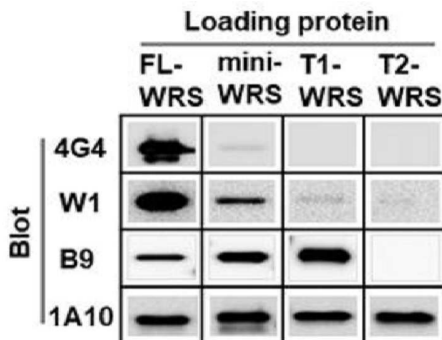
도면12



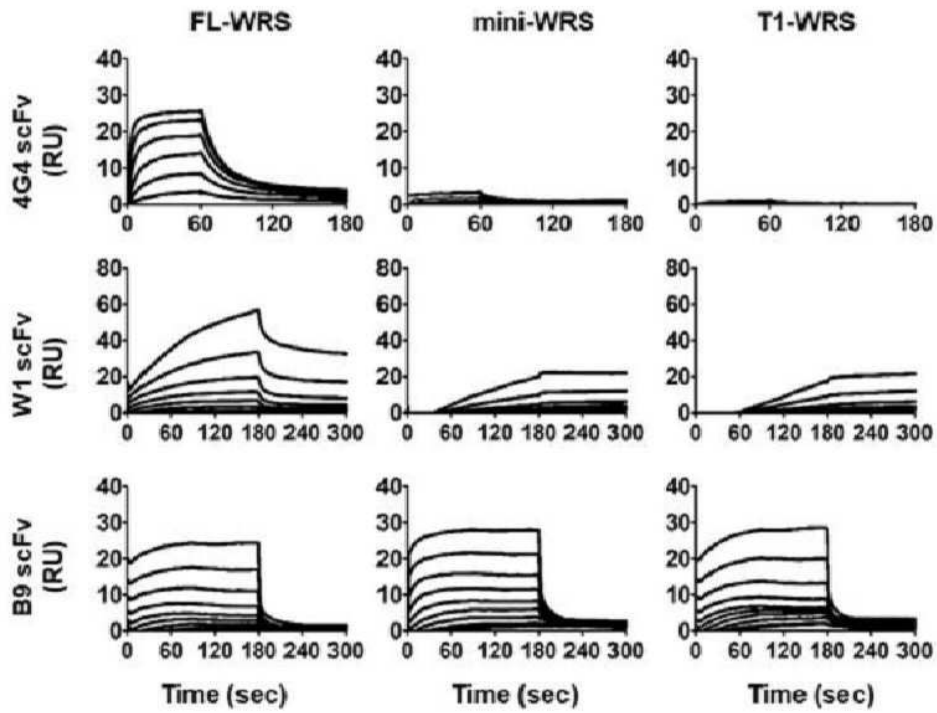
도면13a



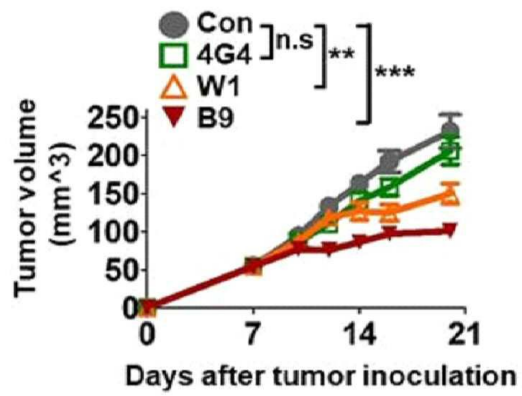
도면13b



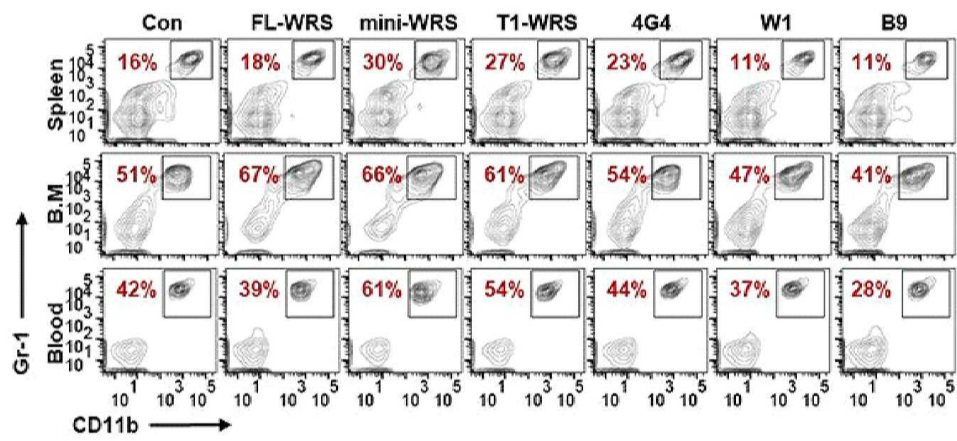
도면13c



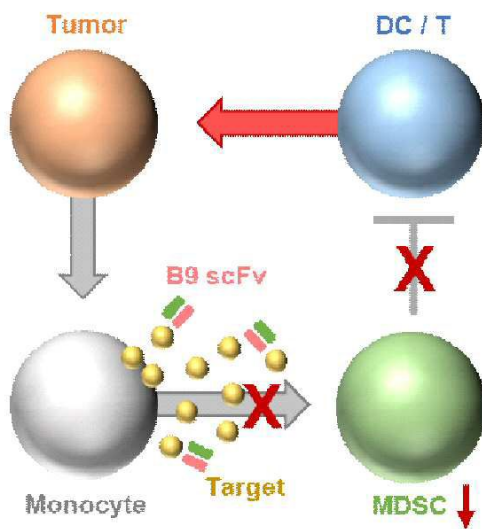
도면14



도면15



도면16



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

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