

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

(43) 국제공개일
2024년 11월 28일 (28.11.2024) WIPO | PCT

WO 2024/242545 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 33/06 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/19 (2006.01) A61K 39/39 (2006.01)
A61K 33/42 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)

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 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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).

(21) 국제출원번호: PCT/KR2024/095840

(22) 국제출원일: 2024년 5월 22일 (22.05.2024)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2023-0066352 2023년 5월 23일 (23.05.2023) KR
63/516,952 2023년 8월 1일 (01.08.2023) US
10-2023-0154511 2023년 11월 9일 (09.11.2023) KR

공개:
— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(71) 출원인: (주) 메티메디제약 (METIMEDI PHARMACEUTICALS CO., LTD.) [KR/KR]; 16006 경기도 의왕시 이미로 40, 디동 701호(포일동, 인덕원아이티밸리), Gyeonggi-do (KR).

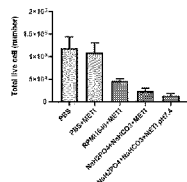
(72) 발명자: 김환목 (KIM, Hwan Mook); 06321 서울특별시 강남구 개포로 310, 166동 2601호 (개포동, 디에이치퍼스티어아이파크), Seoul (KR).

(74) 대리인: 구현서 (KOO, Hyun Seo); 06641 서울특별시 서초구 사암당로 18길 31-11, Seoul (KR).

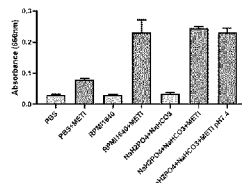
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW,

(54) Title: CANCER VACCINE COMPOSITION COMPRISING CALCIUM LACTATE AS ACTIVE INGREDIENT AND USE THEREOF

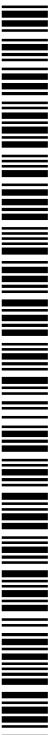
(54) 발명의 명칭: 칼슘 락테이트를 활성 성분으로 포함하는 암 백신 조성물 및 그 용도



(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition comprising, as active ingredients: a) calcium lactate; and b) at least one substance selected from the group consisting of a phosphate, stem cell, cytokine, cancer cell line, antigen derived from the cancer cell line, polynucleotide encoding the antigen, antigen gene construct in which the polynucleotide is operably linked to a promoter, and expression vector comprising the gene construct. The composition of the present invention has an anti-tumor immunological memory effect, induces apoptosis of cancer cells, and thus can be used as an effective immunotherapy candidate for solid cancers, a vaccine candidate for in-situ treatment of solid cancers, and a cancer-treating agent administered into tumors.



(57) 요약서: 본 발명은 a) 칼슘 락테이트 및 b) 인산염, 줄기세포, 사이토카인, 암 세포주, 상기 암세포주 유래 항원, 상기 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드가 프로모터에 작동가능하게 연결된 항원 유전자 컨스트럭트, 및 상기 유전자 컨스트럭트를 포함하는 발현벡터로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 물질을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 항종양 면역기억 효과를 가지며, 암세포에 대한 세포자멸괴사를 유도하여 유효한 고형암의 면역요법제 후보물질 및 고형암의 in Situ 암 치료 백신 후보 물질 및 종양 내 투여 암 치료제로 사용될 수 있다.



WO 2024/242545 A1

명세서

발명의 명칭: 칼슘 락테이트를 활성 성분으로 포함하는 암 백신 조성물 및 그 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 칼슘 락테이트를 활성 성분으로 포함하는 약학 조성물 및 그 용도에 관한 것으로 더욱 상세하게는 칼슘 락테이트를 활성 성분으로 포함하는 암 백신 조성물 및 그 용도이다.

배경기술

- [2] 현재의 암 치료는 통상적으로 비-표적화된 소분자 또는 항체 특이적 세포독성제가 다양한 메커니즘에 의해 암세포에 우선적으로 진입하거나, 이에 결합(항체 특이적 제제의 경우)하고, 암세포를 사멸시키는 전신 화학요법을 수반한다.
- [3] 전신 화학요법은 뇌 전이를 제외하고는 많은 원위 전이 부위에 도달할 수 있으나, 너무 많은 환자 모두에서, 반응은 통상적으로 수명이 짧고(수개월 내지 수년), 궁극적으로는 종양 재발을 발생시킨다.
- [4] 신체의 자연 면역계가 암세포의 인지 후에 암세포를 파괴할 수 있으므로, 암 치료 패러다임에서 면역학적 접근법이 급속하게 더욱 확산되고 있다. 그러나, 일부 암세포 및 더 나아가서 암 줄기세포는 처음에 면역-감시를 피할 수 있으며, 실제로 진화하는 능력을 획득하며, 궁극적으로는 비교적 면역이 보이지 않는 상태로 남겨짐으로써 생존한다[Gaipi et al, Immunotherapy 6:597-610, 2014].
- [5] 전통적 백신 아쥬반트, 예컨대 명반이 면역 반응을 강력하게 하는 하나의 가능한 기전은 DAMP의 방출을 통한 것이다. 아쥬반트, 예컨대 명반은 Th2 반응을 촉진할 수 있고 T 세포 반응과 IgG1 및 IgE의 생산을 유도할 수 있는 숙주세포 DNA의 방출을 유발한다. 이상적으로, 아쥬반트는 분자적으로 정의되어야 하고 세포내 병원체에 대한 보호를 제공하고/또는 종양 부담을 감소시키는 항원에 대한 특이적 면역 반응의 규모 및 기간을 향상시킬 수 있어야 한다.
- [6] STING(Stimulator of Interferon Genes) 단백질의 활성화는 아쥬반트에 의해 생성된 것에 유사하게 활성화된 또는 프라이밍된 면역계를 생성할 수 있다. 이것은 세포내 병원체 또는 바이러스 또는 세포내 병원체 또는 종양의 성장 또는 번식을 억제하는 종양에 의해 도전 또는 재공격시 보호성 또는 예방적 상태를 생성할 수 있다.
- [7] 또한 STING 활성화제가 종양/병원체가 존재하는 시스템에 치료적으로 투여될 때 이것은 2가지 상이하지만 관련된 방식으로 유익하게 작용할 수 있음이 인정될 수 있다. 먼저, 상기에 기재된 바와 같이, 종양/병원체에 대해 직접적으로 작용하도록 유형-I 인터페론 및 사이토카인의 상향조절을 통한 종양/병원체 박멸의 직접적인 수축에 의한다. 두 번째로, STING 활성화제는 병원체 또는 종양으로 재공격 또는 재-접종이 면역계의 일반적인 활성화 및 상기 병원체 또는 종양에 대한 잠

재적 항원-특이적 반응 둘 모두를 통해 저항될 수 있도록 또한 지속적인 면역반응을 유도할 것이다.

- [8] 한편, 네크롭토시스(necroptosis; 세포자멸괴사)는 프로그램된 형태의 괴사(necrosis) 또는 염증성 세포사멸 기작으로서, 2005년 처음 명명된 이래로 2009년부터 RIPK3 (receptor-interacting protein kinase 3) 등 관련 주요 인자의 규명이 이루어지고 있다.
- [9] 네크롭토시스는 세포막의 파열을 유발하는데, 종래의 항암화학 요법(chemotherapy) 또는 최근 부상하고 있는 광역동 치료(photodynamic therapy) 등을 통해 유발되는 면역원성 세포사멸보다 더욱 강한 면역 반응을 수반하는 특징이 있다. 이는 세포 내에서의 단백질 분해나 산화 과정을 수반하지 않기 때문에 위 과정에서 면역원성을 상실하는 DAMP(Damage-associated molecular pattern)와 종양항원이 면역원성을 가진 원래의 상태로 유출되어 효과적으로 항암 면역반응을 유도할 수 있는 것에 기인한다. 상기 특징으로 인하여 네크롭토시스가 기존 항암 치료에 대한 반응성을 증폭시켜 치료 효능을 극대화할 수 있을 것으로 예상된다.
- [10] 그러나, TRAIL을 포함하는 종양괴사인자계 사이토카인, zVAD를 포함하는 pan-caspase 억제제, MLKL 간섭 RNA 등이 개발되었으나 효능이 제한적이었다.
- [11] 따라서 현재 네크롭토시스를 통한 항암 치료는 임상적 활용이 제한적이므로 암 세포에 선택적으로 작용하는 네크롭토시스 유발 제제의 개발이 필요한 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [12] 본 발명은 상기의 문제점을 해결하고, 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 신규한 약학 조성물을 제공하는 것이다.
- [13] 본 발명의 다른 목적은 신규한 암 치료 또는 암 백신 조성물을 제공하는 것이다.
- [14] 본 발명의 또 다른 목적은 신규한 암에 대한 치료 또는 예방 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [15] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 a) 칼슘 락테이트 및
- [16] b) 인산염, 줄기세포, 사이토카인, 암 세포주, 상기 암세포주 유래 항원, 상기 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드가 프로모터에 작동가능하게 연결된 항원 유전자 컨스트럭트, 및 상기 유전자 컨스트럭트를 포함하는 발현벡터로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 물질을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물을 제공한다.
- [17] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 암세포주 유래 항원은 종양특이항원(tumor specific antigen, TSA) 또는 종양연관항원(tumor associated antigen, TAA)이고, 상기 사이토카인은 IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-21 및 GM-CSF로 구성된 군

- 으로부터 선택된 하나 이상의 사이토카인이며, 상기 인산염은 제1인산나트륨 (Monosodium Phosphate)인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [18] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 조성물은 탄산염을 추가로 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [19] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 조성물에서, 칼슘 락테이트는 2.5mM, 내지 54mM, 상기 인산염은 5mM 이상인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [20] 또 본 발명은 a) 칼슘 락테이트 및 b) 인산염, 줄기세포, 사이토카인, 암 세포주, 상기 암세포주 유래 항원, 상기 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드가 프로모터에 작동가능하게 연결된 항원 유전자 컨스트럭트, 및 상기 유전자 컨스트럭트를 포함하는 발현벡터로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 물질을 유효성분으로 포함하는 암 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [21] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 암세포주 유래 항원은 종양특이항원 (tumor specific antigen, TSA) 또는 종양연관항원 (tumor associated antigen, TAA) 이고, 상기 사이토카인은 IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-21 및 GM-CSF로 구성된 군 으로부터 선택된 하나 이상의 사이토카인이며, 상기 인산염은 제1인산나트륨 (Monosodium Phosphate)인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [22] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 조성물은 탄산염을 더욱 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [23] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 조성물에서, 칼슘 락테이트는 2.5mM 내지 54mM, 상기 인산염은 5mM 이상인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [24] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 암은 대장암, 폐암, 위암, 신경교종, 간 암, 흑색종, 신장암, 요로상피암, 두경부암, 메르켈세포종(Merkel-cell carcinoma), 전립선암, 혈액암, 유방암, 결장암, 직장암, 췌장암, 뇌암, 난소암, 방광암, 기관지 암, 피부암, 자궁경부암, 자궁내막암, 식도암, 갑상선암, 골암 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 암인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [25] 또한 본 발명은 a) 칼슘 락테이트 및 b) 인산염, 줄기세포, 사이토카인, 암 세포 주, 상기 암세포주 유래 항원, 상기 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 상 기 폴리뉴클레오타이드가 프로모터에 작동가능하게 연결된 항원 유전자 컨스트 러کت, 및 상기 유전자 컨스트럭트를 포함하는 발현벡터로 구성된 군으로부터 선 택된 하나 이상의 물질을 유효성분으로 포함하는 암 백신 조성물을 제공한다.
- [26] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 암세포주 유래 항원은 종양특이항원 (tumor specific antigen, TSA) 또는 종양연관항원 (tumor associated antigen, TAA) 이고, 상기 사이토카인은 IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-21 및 GM-CSF로 구성된 군 으로부터 선택된 하나 이상의 사이토카인이며, 상기 인산염은 제1인산나트륨 (Monosodium Phosphate)인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [27] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 조성물은 탄산염을 추가로 포함하는 것 이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

- [28] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 조성물에서, 칼슘 락테이트는 2.5mM 내지 54mM, 상기 인산염은 5mM 이상인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [29] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 조성물은 종양내 투여(intratumoral injection)되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [30] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 암은 대장암, 폐암, 위암, 신경교종, 간암, 흑색종, 신장암, 요로상피암, 두경부암, 메르켈세포종(Merkel-cell carcinoma), 전립선암, 혈액암, 유방암, 결장암, 직장암, 췌장암, 뇌암, 난소암, 방광암, 기관지암, 피부암, 자궁경부암, 자궁내막암, 식도암, 갑상선암, 골암 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 암인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [31] 또한 본 발명은 a) 칼슘 락테이트 및 b) 인산염, 줄기세포, 사이토카인, 암 세포주, 상기 암세포주 유래 항원, 상기 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드가 프로모터에 작동가능하게 연결된 항원 유전자 컨스트럭트, 및 상기 유전자 컨스트럭트를 포함하는 발현벡터로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 물질을 유효성분으로 포함하는 조성물을 암 질환을 가지는 대상에 투여하는 것을 포함하는 암의 치료 또는 예방 방법을 제공한다.
- [32] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 암세포주 유래 항원은 종양특이항원(tumor specific antigen, TSA) 또는 종양연관항원(tumor associated antigen, TAA)이고, 상기 사이토카인은 IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-21 및 GM-CSF로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 사이토카인이며, 상기 인산염은 제1인산나트륨(Monosodium Phosphate)인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [33] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 조성물은 탄산염을 추가로 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [34] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 조성물에서, 칼슘 락테이트는 2.5mM 내지 54mM, 상기 인산염은 5mM 이상인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [35] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 조성물은 종양내 투여(intratumoral injection)되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [36] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 암은 대장암, 폐암, 위암, 신경교종, 간암, 흑색종, 신장암, 요로상피암, 두경부암, 메르켈세포종(Merkel-cell carcinoma), 전립선암, 혈액암, 유방암, 결장암, 직장암, 췌장암, 뇌암, 난소암, 방광암, 기관지암, 피부암, 자궁경부암, 자궁내막암, 식도암, 갑상선암, 골암 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 암인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [37] 이하 본 발명의 추가로 설명한다.
- [38] 상기 본 발명의 조성물은 약제학적 조성물로서, 상술한 칼슘 락테이트 외에 약제학적으로 허용되는 부형제, 또는 담체를 포함한다.
- [39] 본 명세서에서 용어 "약제학적으로 허용되는"은 조성, 제형, 안전성, 환자 허용성 및 생물 이용성에 대해 약리학/독성학적 관점으로부터 환자에게 허용되고 물리적/화학적 관점으로부터 조제 약제사에 대해 허용되는 특성들 및/또는 물질

을 언급한다. "약제학적으로 허용되는 담체"는 활성 성분(들)의 생물학적 활성의 효과를 방해하지 않는 매질을 언급하며, 투여시 숙주에 무독성이다.

[40] 본 발명의 약학 조성물의 적용 대상체는 모든 동물일 수 있으며, 구체적으로 포유동물, 예를 들어 사람, 마우스, 래트, 햄스터, 기니아 피그, 토끼, 고양이, 개, 원숭이, 소, 말, 돼지 등이다. 가장 바람직한 대상체는 사람이다.

[41] 본 발명의 약학 조성물은 당해 기술 분야에서 적합한 임의의 수단에 따라 동결-건조되거나 액체 제제로서 제형화 될 수 있다. 액체 형태의 제제의 비제한적 예는 용액, 현탁물, 시럽, 슬러리 및 에멀전을 포함한다. 적합한 액체 담체는 모든 적합한 유기 또는 무기 용매, 예를 들어 물, 알콜, 식염수, 완충된 식염수, 생리 식염수, 텍스트로즈 용액, 프로필렌 글리콜 용액 등을 포함하며, 바람직하게는 멸균 형태로 존재한다.

[42] 본 발명의 약학 조성물은 중성 또는 염 형태로 제형화 될 수 있다. 약제학적으로 허용되는 염은 산부가염 (활성 폴리펩타이드의 유리 아미노 그룹과 함께 형성됨)을 포함하며, 이는 무기산, 예를 들어 염산 또는 인산, 또는 유기산, 예를 들어 아세트산, 옥살산, 타르타르산, 만델산 등과 함께 형성된다. 또한, 유리 카복실 그룹으로부터 형성되는 염은 무기 염기, 예를 들어 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘 또는 제2철 수산화물, 및 유기 염기, 예를 들어 이소프로필아민, 트리메틸아민, 2-에틸아미노 에탄올, 히스티딘, 프로카인 등으로부터 유도될 수 있다.

[43] 본 발명의 약학 조성물은 바람직하게는 대상체에게 접종 또는 주사하기 위해 제형화된다. 주사를 위해, 본 발명의 조성물은 수성 용액, 예를 들어 물 또는 알콜 중에 또는 생리학적으로 적합한 완충액, 예를 들어 헵크스 (Hanks) 용액, 링거 (Ringer) 용액 또는 생리학 적 식염 완충액 중에 제형화 될 수 있다. 용액은 제형화제, 예를 들어 현탁제, 보존제, 안정화제 및/또는 분산제를 포함할 수 있다. 또한, 주사 제형은, 예를 들어 사용하기 전에 적합한 비히클, 예를 들어 멸균수, 식염수 또는 알콜로 재구성함으로써, 사용 직전에 주사에 적합한 액체 형태 제제로 전환되는 고체 형태 제제로 제조될 수 있다.

[44] 또한, 본 발명의 조성물은 지연 방출 비히클 또는 데포 (depot) 제제로 제형화될 수 있다. 이러한 장기간 작용 제형은 접종 또는 이식 (예를 들어 피하 또는 근육내)에 의하거나 주사에 의해 투여될 수 있다.

[45] 본 발명의 조성물은 주입 또는 주사 (예: 정맥내, 근육내, 피내, 피하, 경막내, 십이지장내, 복강내 등)에 의해 투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 비내, 질, 직장, 경구, 또는 경피로 투여될 수 있다. 추가로, 본 발명의 조성물은 "바늘-없는" 전달 시스템에 의해 투여될 수 있다. 바람직하게는, 조성물은 피내 주사에 의해 투여된다. 투여는 의사 또는 의료 보조원의 지시에 따를 수 있다.

[46] 주사는 수회 주사로 나뉠 수 있으며, 이러한 분할 접종은 바람직하게는 실질적으로 동시에 투여된다. 분할 접종으로 투여되는 경우, 면역원의 용량은 바람직하게는, 반드시 필수적이지는 않지만, 각각의 분리된 주사시 동등하게 할당된다. 애주번트가 백신 조성물에 존재하는 경우, 애주번트의 용량은 바람직하게는, 반

드시 필수적이지는 않지만, 각각의 분리된 주사시 동등하게 할당된다. 분할 접종을 위한 분리된 주사는 일부 양상으로 환자의 신체에서 실질적으로 서로 인접하게 투여된다.

- [47] 다양한 대안적 약제학적 전달 시스템이 이용될 수 있다. 이러한 시스템의 비제한적 예는 리포솜 및 에멀전을 포함한다. 특정 유기 용매, 예를 들어 디메틸설폭 사이드가 또한 사용될 수 있다. 추가로, 본 발명의 조성물은 지연 방출 시스템, 예를 들어 치료제를 포함하는 고형 중합체의 반투과성 매트릭스를 사용하여 전달될 수 있다. 이용 가능한 다양한 지연 방출 물질이 당업자에게 널리 알려져 있다. 지연 방출 캡슐은, 이들의 화학적 특성에 따라, 수일 내지 수주 내지 수개월의 범위에 걸쳐 백신 조성물을 방출할 수 있다.
- [48] 암 완화 상태에 있는 환자에서 암의 재발을 예방하기 위해서, 치료학적 유효량의 본 발명의 조성물이 대상체에게 투여된다. 치료학적 유효량은, 당해 기술 분야에서 적합한 임의의 수단에 의해 측정시, 환자에서 종양 연관 항원특이적 세포독성 T-림프구 (CD8+) 수의 임상적으로 유의한 증가 및 항원에 대한 세포독성 T-림프구 반응의 임상적으로 유의한 증가를 제공할 것이다. 대체로 환자에서, 치료학적 유효량의 백신 조성물은 남아있는 미세한 질환을 파괴하여 환자에서 암의 재발 위험을 유의하게 감소 또는 제거시킬 것이다.
- [49] 본 발명의 조성물의 유효량은, 이로 제한됨이 없이, 인종, 품종, 치수, 신장, 체중, 연령, 환자의 전체적 건강 상태, 제형의 유형, 투여 방식 또는 방법, 또는 암이 환자에서 재발할 가능성을 상당히 증가시키는 위험 인자의 존재 또는 부재를 포함하여 많은 변수에 의존적일 수 있다. 이러한 위험 인자는, 이로 제한됨이 없이, 수술 유형, 림프절의 상태 및 양성의 수, 종양의 크기, 종양의 조직학적 등급, 호르몬 수용체 (에스트로겐 및 프로게스테론 수용체)의 존재/부재, HER2/neu 발현, 림프혈관 침윤 및 유전적 소인 (BRCA 1 및 2 등)를 포함한다. 일부 바람직한 양태에서, 유효량은 환자가 림프절 양성 또는 림프절 음성인지의 여부에 의존적이며, 환자가 림프절 양성인 경우 양성 림프절의 수 및 정도에 의존적이다. 모든 경우에서, 적합한 유효량은 일반적으로 통상적인 최적화 기술 및 전문가의 능숙하고 정통한 판단 및 당업자에게 분명한 기타 인자들을 이용하여 당업자에 의해 결정될 수 있다. 바람직하게는, 본원에 기술되는 치료학적 유효량의 백신 조성물은 대상체에게 실질적인 독성을 일으키지 않으면서 치료학적 예방 이점을 제공할 것이다.
- [50] 본 발명의 조성물의 독성 및 치료 효율은, 예를 들어 LD50 (집단의 50%에 치명적인 용량) 및 ED50 (집단의 50%에 치료학적으로 효과적인 용량)을 측정하기 위한, 세포 배양물 또는 실험 동물에서 표준 약제학적 절차에 의해 측정될 수 있다. 독성과 치료 효과 사이의 용량 비율이 치료 지수이며, 이는 LD50/ED50의 비율로 표현될 수 있다. 큰 치료 지수를 나타내는 조성물이 바람직하다. 세포 배양 검정 및 동물 연구로부터 얻어지는 자료는 환자에서 사용하기 위한 일정 범위의 용량을 제형화 하는데 이용될 수 있다. 이러한 조성물의 용량은 바람직하게는 독성이

매우 적거나 없는 ED50을 포함하는 일정 범위의 순환 농도 내에 속한다. 용량은 사용되는 용량 형태 및 이용되는 투여 경로에 따라 이러한 범위 내에서 다양할 수 있다.

- [51] 재발암의 예방에 있어 투여 용량의 크기는 다른 요인들 중에서 환자 상태의 중증도, 재발에 대한 상대적 위험 또는 투여 경로에 따라 다양할 것이다. 환자 상태의 중증도는, 예를 들어 부분적으로 표준 예후적 평가 방법에 의해 평가될 수 있다.
- [52] 본 발명의 백신 조성물은 암의 재발에 대해 보호 면역을 유도 및/또는 지지하기 위하여, 세포독성 T 림프구 반응을 유도 및/또는 지지하기 위하여 적합한 임의의 스케줄로 환자에게 투여될 수 있다. 예를 들어, 일차 예방접종으로서 본원에서 기술되고 예시되는 바와 같은 백신 조성물을 환자에게 투여한 후, 보호 면역을 지지 및/또는 유지하기 위해 부스터를 투여할 수 있다. 일부 양상에서, 백신 조성물은 1개월 당 1회, 2회 또는 그 이상의 횟수로 환자에게 투여될 수 있다.
- [53] 일차 예방접종 및 부스터 접종을 포함한 백신 투여 스케줄은, 환자에게 필요한, 환자의 수명을 연장하기 위해, 예를 들어 수년의 과정에 걸쳐 계속될 수 있다. 일부 양상으로, 백신 스케줄은 백신 요법의 시작시에 보다 빈번한 투여를 포함하며, 보호 면역을 유지하기 위한 시간 동안은 보다 덜 빈번한 투여 (예: 부스터)를 포함한다.
- [54] 백신 조성물은 백신 요법의 시작시에는 보다 저용량이 투여되고, 시간이 지남에 따라 보다 고용량이 투여될 수 있다. 또한, 백신은 백신 요법의 시작시에는 보다 고용량이 투여되고, 시간이 지남에 따라 보다 저용량이 투여될 수 있다. 일차 백신 및 부스터 투여의 횟수 및 투여되는 항원의 용량은, 당해 기술 분야에서 적합한 임의의 수단에 따라 담당 의사에 의해 결정되는 바와 같이, 개개 환자의 특정 요구를 만족시키도록 맞춰지고/지거나 조절될 수 있다.
- [55] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 백신 조성물은 암 치료 및 예방용이다.
- [56] 본 명세서에서 용어, "예방"은 방사선학적 또는 신체 조사의 결과를 포함하여 임의의 객관적 또는 주관적 변수로 측정시, 임상적 완화 상태의 환자에서 암의 재발(recurrence/relapse)을 미리 막는데 있어서의 모든 성공 또는 성공의 징후를 언급한다.
- [57] 본 발명의 명세서 및/또는 도면에서 사용된 'METI-101'이란 용어는 칼슘락테이트를 의미한다.

발명의 효과

- [58] 본 발명의 칼슘 락테이트는 종양세포 내부의 면역활성 유도인자인 STING의 발현을 증가시키고 동시에 STING의 활성화를 일으켜서 STING의 작용제(agonist)로 역할을 할 수 있으며, 면역 체계 활성화를 통해 항종양 면역 반응을 유도할 수 있을 뿐만 아니라 2차 면역에 효과를 나타낼 수 있음을 알 수 있으며, re-challenge 실험 결과 항종양 면역기억 효과를 가지는 것을 확인하였으며,

[59] 본 발명의 조성물은 암세포에 대한 세포자멸괴사를 유도하여 유효한 고형암의 면역요법제 후보물질 및 고형암의 in Situ 암 치료 백신 후보 물질 및 종양 내 투여 치료제로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [60] 도 1은 METI-101에 의한 인간 암 세포주의 세포사멸 형태와 세포에 따른 효과 비교를 나타낸 그림(#p<0.0001 vs Control, N.S. Not Significant),
- [61] 도 2는 METI-101에 의한 인간 암 세포주의 세포 사멸 효과에 대한 비율을 나타낸 그림 (***p<0.001 vs Control, #p<0.0001 vs Control, N.S. Not Significant),
- [62] 도 3은 Meti-101에 의한 Necroptosis 인자 발현 확인을 나타낸 그림,
- [63] 도 4는 Meti-101에 의해 유도된 STING과 활성화 STING의 정량을 나타낸 그림 (***p<0.001 vs Control, #p<0.0001 vs Control),
- [64] 도 5는 인간 암세포주에서 METI-101에 의한 Interferon α 와 β 의 mRNA 발현 양을 나타낸 그림 (**p<0.005 vs Control, ***p<0.001 vs Control, #p<0.0001 vs Control),
- [65] 도 6은 Meti-101에 의한 인간 암세포주의 Interferon receptor 합성 촉진을 나타낸 그림 (**p<0.005 vs Control, ***p<0.001 vs Control, #p<0.0001 vs Control),
- [66] 도 7은 인간 암세포주에서 Type I interferon의 신호를 전달하는 IRF7의 변화와 MHC1의 증가를 나타낸 그림 (*p<0.01 vs Control, ***p<0.001 vs Control, #p<0.0001 vs Control),
- [67] 도 8은 인간 암세포에서 Meti-101 처리에 의한 면역 반응 유도 물질인 Chemokine의 발현 양 변화를 나타낸 그림(**p<0.005 vs Control, ***p<0.001 vs Control, #p<0.0001 vs Control),
- [68] 도 9는 Meti-101 처리에 의한 인간 암세포주의 CD24와 CD47 감소를 나타낸 그림 (**p<0.005 vs Control, ***p<0.001 vs Control),
- [69] 도 10은 VEGF 생성억제에 의한 HUVEC세포의 신생혈관 생성 억제를 나타낸 그림,
- [70] 도 11은 TGF- β 처리에 의한 섬유아세포의 분화와 Meti-101의 분화억제 효과를 나타낸 그림,
- [71] 도 12는 Meti-101에 의한 인간 암세포주의 TGF- β 분비량 감소를 나타낸 그림,
- [72] 도 13은 세포 내 Lactate 농도 및 pH농도 변화도를 나타낸 그림 (*p<0.01 vs Control, **p<0.005 vs Control),
- [73] 도 14는 A549 와 H1975 폐암 세포주에서 PD-L1 발현 분석을 나타낸 그림,
- [74] 도 15는 종양 내 VEGF 변화 및 CD31의 조직학적 분석도를 나타낸 그림 (***p<0.005 vs Control),
- [75] 도 16은 마우스 대장암 세포주 MC-38를 이용한 xenograft 마우스 모델에서 MSC와 Meti-101병용투여의 암 성장 억제 효과 평가를 나타낸 그림,

- [76] 도 17은 MC-38 세포주를 이용하여 면역기억 효과 확인 비교도를 나타낸 그림 (*p<0.01 vs Control),
- [77] 도 18은 마우스 비장에서 White pulp 변화를 나타낸 그림,
- [78] 도 19는 Tumor size와 White pulp 크기에 따른 면역 분포도를 나타낸 그림,
- [79] 도 20은 TC-1 세포주를 이용한 폐암세포 동물모델에서의 peptide vaccine 과 Meti-101 병용투여 확인을 나타낸 그림,
- [80] 도 21은 IL-7과 Meti-101 병용투여에 의한 MC-38 동물모델에서의 항종양평가 확인을 나타낸 그림.
- [81] 도 22 내지 24는 10% FBS가 들어간 RPMI1640 배지(도 22), 무혈청 RPMI1640 배지(도 23) 그리고 무혈청 RPMI1640 배지(도 24)에 칼슘락테이트를 처리하여 배양한 사진이다.
- [82] 도 25는 HCT-116 대장암 세포주를 무혈청 RPMI1640 배지에 배양하여 칼슘락테이트의 세포자멸괴사 유도 효과를 보여주는 사진이고,
- [83] 도 26은 HCT-116을 무혈청 RPMI1640 배지에 배양한 세포와 무혈청 RPMI1640 배지에 칼슘락테이트를 처리하여 배양한 세포의 세포 생존율을 수치화한 그래프이다.
- [84] 도 27은 HCT-116 대장암 세포를 무혈청 DMEM, IMEM, RPMI1640 배지에 칼슘락테이트를 첨가하여 배양한 사진이고,
- [85] 도 28은 칼슘락테이트가 처리된 무혈청의 DMEM, IMEM 그리고 RPMI1640 배지에서 대장암 세포 생존율을 비교한 그래프이다.
- [86] 도 29는 METI-101으로 암세포의 세포자멸괴사를 유도했을 때, 암세포에서 면역 유도와 관련된 단백질 인자들을 확인한 그래프이며, 도 30은 세포자멸괴사가 일어나고 있는 암세포의 면역 표지자 및 신호전달 핵심 단백질을 면역 블로팅으로 확인한 사진이고, 도 31은 인터페론의 발현양을 mRNA 수준에서 확인한 그래프이다.
- [87] 도 32는 종양 연관 항원의 한 종류인 TSPAN8 단백질을 효소 결합 면역 흡착제 분석을 통해 확인한 그래프이고, 도 33은 종양 마커의 한 종류인 CA9 단백질을 효소 결합 면역 흡착제 분석을 통해 확인한 그래프이다.
- [88] 도 34는 세포가 손상을 받았을 때 사멸이 일어나면서 세포 밖으로 유출되는 핵산의 양을 측정된 결과이고, 도 35는 세포가 손상을 받았을 때 사멸이 일어나면서 세포 밖으로 유출되는 대표적인 세포 손상 단백질의 양을 측정된 결과이다.
- [89] 도 36은 쥐에 인간 암세포주인 HCT116을 이종 이식하여 성장시킨 종양에서 METI-101을 종양 내 직접 주사 방법을 통해 세포자멸괴사를 일으키고, 그 마커인 활성형MLKL을 면역조직화학으로 염색해서 확인한 사진이다.
- [90] 도 37은 쥐에 인간 암세포주인 HCT116을 이종 이식하여 성장시킨 종양에서 METI-101을 종양 내 직접 주사 방법을 통해 세포자멸괴사를 일으키고, 종양 내 림프구의 분포를 헤마토실린-에오신 염색을 통해 확인한 사진이다.

- [91] 도 38은 표준 치료법인 방사선 조사와 METI-101의 종양 내 주사를 통해 암 백신화가 유도됨을 확인하기 위한 동물 실험 모식도이다.
- [92] 도 39는 방사선 조사와 METI-101의 종양 내 주사에 대한 결과와 함께 암 세포를 재 투여했을 때 종양이 형성되는 빈도를 나타낸 그래프이다.
- [93] 도 40은 Welgene사 RPMI1640 배지를 이용한 세포자멸괴사와 동일한 현상을 보이는 조건인 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{NaHCO}_3$ 용액에서 METI-101에 의해 세포자멸괴사가 유도된 세포사진이고, 도 41은 Welgene사 RPMI1640 배지와 비교하여 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{NaHCO}_3$ 용액에서의 METI-101에 의한 세포자멸괴사와 탁도를 측정된 결과이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [94] 이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 의도로 기재한 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.
- [95] 실시예 1. 여러 암세포에서 Necroptosis에 의한 세포사멸
- [96] 면역유도성 세포손상유도물질(DAMP)의 정량
- [97] 주성분인 락트산칼슘오수화물이 면역유발물질인 세포손상유도물질(DAMP) 생성정도를 정량하였다. 세포손상유도물질(DAMP)이 활성화되어, 인간 암세포주에 선택적인 면역 유도성 세포 사멸을 확인하였다. 이를 위해 인체 암세포, 마우스 암세포, 인체 정상세포인 섬유소세포를 비교하였다.
- [98] 사람의 대장암(HCT-116), 췌장암(AsPC-1) 그리고 유방암(MDA-MB-231) 세포주와 쥐의 대장암(MC-38, CT-26) 세포주를 60mm cell culture dish에 각각 3.5×10^5 cells/well의 세포 수로 접종했다. 대조군으로는 태아의 폐 조직에서 유래된 세포주(MRC-5)를 사용하여 암세포와 같은 조건으로 접종했다. 접종 후 세포의 안정화를 위해 24시간 동안 $37^\circ\text{C} 5\% \text{CO}_2$ 조건에서 배양했다. 안정화된 세포들은 FBS를 제거하기 위해 PBS로 세척한 후 FBS가 없는 배지에서 정상 산소 조건($37^\circ\text{C} 5\% \text{CO}_2$)과 저 산소 조건($37^\circ\text{C} 5\% \text{CO}_2, 1\% \text{O}_2$)으로 22시간 배양했다. 배양된 세포는 PBS로 세척한 후 FBS가 없는 배지에 Meti-101 2.5mM의 농도로 2시간 동안 처리했다. 이 후 현미경을 통해 세포 사멸을 얻었으며, 세포 배양액을 일정량 취하여 분광 광도계에서 660nm 파장의 흡광도를 측정했다.
- [99] 세포 관찰 결과 2.5mM Meti-101을 처리한 인간 암 세포는 정상적인 세포의 형태를 찾아볼 수 없었으며, 세포의 부산물이 배지로 유입되어 660nm의 파장에서 배지의 흡광도가 증가하는 것을 확인했다($p < 0.0001$). 마우스 암세포의 경우 인간 암세포 보다는 Meti-101의 효과가 비교적 작았으며, 암세포가 아닌 일반 세포의 경우 Meti-101에 의한 세포 사멸이 거의 일어나지 않은 것으로 확인됐다. 이 결과는 Meti-101이 정상세포의 손상은 최소화하며, 인간 암세포에서 유의미하게 사멸을 유도하는 항암제로써 효과가 있음을 확인했다(도 1).
- [100] 면역유도성 세포사멸의 정량

- [101] 주성분인 락트산칼슘오수화물이 인체 암세포주에 선택적인 면역유도성 세포 사멸 유도를 확인하기 위해 대장암, 췌장암, 유방암 그리고 폐암을 선별하였고, 비교군으로 마우스 대장암을 사용하였다.
- [102] 사람의 대장암(HCT-116), 췌장암(AsPC-1), 비소세포폐암(H1299) 그리고 유방암(MDA-MB-231) 세포주와 쥐의 대장암(MC-38, CT-26) 세포주를 60mm cell culture dish에 각각 3.5×10^5 cells/well의 세포 수로 접종했다. 접종 후 세포의 안정화를 위해 24시간 동안 $37^\circ\text{C} 5\% \text{CO}_2$ 조건에서 배양했다. 안정화된 세포들은 FBS를 제거하기 위해 PBS로 세척한 후 FBS가 없는 배지에서 정상 산소 조건($37^\circ\text{C} 5\% \text{CO}_2$)과 저 산소 조건($37^\circ\text{C} 5\% \text{CO}_2, 1\% \text{O}_2$)으로 22시간 배양했다. 배양된 세포는 PBS로 세척한 후 FBS가 없는 배지에 Meti-101 2.5mM의 농도로 2시간 동안 처리했다. 배양 후 trypsin으로 세포를 떨어뜨려 conical tube에 모아 원심분리기에 서 세포를 침전시켰다. 상층액을 버린 후 배지로 재부유 시켜주고 $10\mu\text{l}$ 를 취하여 hemocytometer로 살아있는 세포의 개수를 측정했다.
- [103] 인간 암세포주의 경우 Meti-101을 처리하면 세포의 사멸이 유도되어 살아있는 세포를 찾아볼 수 없었다. 하지만 마우스 암세포주의 경우 Meti-101이 인간 암세포주처럼 세포 사멸을 유도하지 못지만 유의미하게 암세포의 사멸을 유도했다. 이를 토대로 Meti-101은 암세포 특이적으로 작용하며 특히 인간 암세포주에 선택적인 면역 유도성 세포사멸을 촉발할 수 있다는 점을 확인하였다(도 2).
- [104] 면역유도성 necroptosis로 인한 세포사멸 관련 인자 확인
- [105] 세포사멸 종류 중 하나인 necroptosis를 확인하기 위하여 RIP1, p-RIP1, RIP3, p-RIP3, MLKL, p-MLKL를 변화를 관찰하였다. 인체 대장암, 췌장암, 폐암, 유방암 세포주를 이용하여 세포내 단백질을 이용하여 면역자기영동(WB)로 확인하였다.
- [106] 사람의 대장암(HCT-116), 췌장암(AsPC-1), 폐암(H1299), 유방암(MDA-MB-231) 세포주를 60mm cell culture dish에 각각 3.5×10^5 cells/well의 세포 수로 접종했다. 접종 후 세포의 안정화를 위해 24시간 동안 $37^\circ\text{C} 5\% \text{CO}_2$ 조건에서 배양했다. 안정화된 세포들은 PBS로 세척한 후 0% FBS와 2.5mM의 Meti-101이 포함된 RPMI-1640배지에서 저 산소 조건($37^\circ\text{C} 5\% \text{CO}_2, 1\% \text{O}_2$)으로 1시간 배양했다. 배양된 세포는 RIPA buffer로 모아서 단백질을 추출했다. 추출한 단백질은 Protein assay를 통해 정량해서 단백질을 크기에 따라 분리한 후 RIP1, p-RIP1, RIP3, p-RIP3, MLKL, p-MLKL 특이적인 항체를 붙여 단백질의 형광 정도를 확인함으로써 암세포에서 Meti-101에 의한 necroptosis 관련 인자들의 활성화 단백질 발현양을 비교했다.
- [107] 실험 결과 Meti-101은 Necroptosis 관련 인자들에서 RIP1, RIP3, MLKL의 발현을 감소시켰으며 동시에 p-RIP1, p-RIP3, p-MLKL의 활성화를 감소시켰다. 이를 통해 Meti-101은 세포사멸 종류 중 하나인 Necroptosis를 일으키는 것을 알 수 있다(도 3).

- [108] 실시에 2. 항종양 면역활성 유도의 확인
- [109] 종양내재성 면역활성 유도인자 STING 및 신호전달 확인
- [110] 락트산칼슘오수화물에 의한 항종양면역반응 유도를 확인하기 위하여 종양세포 내부의 면역활성 유도인자인 STING의 변화를 관찰하였다. 인체 대장암 및 췌장암 세포주를 이용하여 세포내 DAMP인 dsDNA에 대한 반응인자인 STING 과 활성화형 STING의 유도를 면역자기영동(WB)로 확인하였다.
- [111] 사람의 대장암(HCT-116)과 췌장암(AsPC-1) 세포주를 60mm cell culture dish에 각각 3.5×10^5 cells/well의 세포 수로 접종했다. 접종 후 세포의 안정화를 위해 24시간 동안 37°C 5% CO₂ 조건에서 배양했다. 안정화된 세포들은 PBS로 세척한 후 10% FBS와 2.5mM의 Meti-101이 포함된 RPMI-1640배지에서 저 산소 조건 (37°C 5% CO₂, 1% O₂)으로 24시간 배양했다. 배양된 세포는 RIPA buffer로 모아서 단백질을 추출했다. 추출한 단백질은 Protein assay를 통해 정량해서 단백질을 크기에 따라 분리한 후 STING 특이적인 항체를 붙여 단백질의 형광 정도를 확인함으로써 암세포에서 Meti-101에 의한 STING(Stimulator of Interferon Genes)과 활성화 STING의 단백질 발현양을 비교했다.
- [112] 실험 결과 Meti-101은 종양세포 내부의 면역활성 유도인자인 STING의 발현을 증가시키고 동시에 STING의 활성화를 일으켰다. 이를 통해 Meti-101은 STING의 작용제(agonist)로 역할을 할 수 있으며, 면역 체계 활성화를 통해 항종양 면역 반응을 유도할 수 있을 뿐만 아니라 2차 면역에 효과를 나타낼 수 있음을 알 수 있다(도 4).
- [113] 종양내재성 면역활성 Type I interferon 생성량 확인
- [114] 락트산칼슘오수화물에 의한 항종양면역반응 유도를 확인하기 위하여 종양세포에 의해 생성되는 Type I interferon 인 IFN- α 와 IFN- β 의 생성량을 정량하였다. 인체 대장암, 유방암 및 췌장암 세포주에 대하여 RT-PCR을 사용하여 활성화형 STING에 의해 유도되는 Type I interferon mRNA 양을 정량하였다.
- [115] 사람의 대장암(HCT-116), 유방암(MDA-MB-231) 그리고 췌장암(AsPC-1) 세포주를 60mm cell culture dish에 각각 3.5×10^5 cells/well의 세포 수로 접종했다. 접종 후 세포의 안정화를 위해 24시간 동안 37°C 5% CO₂ 조건에서 배양했다. 안정화된 세포들은 PBS로 세척한 후 10% FBS와 2.5mM의 Meti-101이 포함된 RPMI-1640 배지에서 저 산소 조건(37°C 5% CO₂, 1% O₂)으로 24시간 배양했다. 배양된 세포는 trizol을 이용하여 mRNA를 추출했다. mRNA는 정량을 통해 서로 동일한 양의 cDNA를 합성했으며, Syber green과 타겟 Primer를 토대로 qRT-PCR을 진행하여 Type I interferon의 발현 정도를 정량 비교하였다.
- [116] Type I interferon에 속해 있는 IFN- α 와 IFN- β 는 Meti-101에 의해 mRNA의 발현이 약 2.5~3배 증가하는 것을 확인했다. 증가된 interferon은 자연살해세포(NK cell)와 대식세포를 활성화시켜 선천면역 반응을 증가시키며, 구조적 적합성 복합체(MHC)합성을 촉진하여 세포 표면에 항원을 표현한다. 그러므로 Meti-101에

의한 Type I interferon의 mRNA 발현량의 증가는 면역 세포들이 암세포를 항원으로 인식하도록 제시해주며 원활하게 암세포를 공격할 수 있도록 돕는다(도 5).

[117] 종양세포 표면의 Type I interferon 수용체 발현 확인

[118] 락트산칼슘오수화물에 의한 항종양 면역반응 유도를 확인하기 위하여 종양세포에 의해 생성되는 Type I interferon 수용체인 IFNAR1과 IFNAR2의 mRNA 및 단백질 발현량을 정량하였다. 인체 대장암, 유방암 및 췌장암 세포주에 대하여 RT-PCR과 면역자기영동(WB)로 확인하였다. 이를 통해 암세포의 Type I interferon의 반응성을 확인하고자 하였다.

[119] 사람의 대장암(HCT-116), 췌장암(AsPC-1), 유방암(MDA-MB-231) 세포주를 60mm cell culture dish에 각각 3.5×10^5 cells/well의 세포 수로 접종했다. 접종 후 세포의 안정화를 위해 24시간 동안 37°C5% CO₂ 조건에서 배양했다. 안정화된 세포들은 PBS로 세척한 후 10% FBS와 2.5mM의 Meti-101이 포함된 RPMI-1640 배지에서 저 산소 조건(37°C5% CO₂, 1% O₂)으로 24시간 배양했다. 배양된 세포는 단백질을 얻기 위해 RIPA buffer를 사용했으며, Trizol을 이용하여 mRNA를 추출했다. 추출한 단백질은 Protein assay를 통해 정량해서 단백질을 크기에 따라 분리한 후 Interferon receptor 특이적인 항체를 붙여 단백질의 형광 정도를 확인함으로써 암세포에서 Meti-101에 의한 Interferon receptor1과 Interferon receptor2의 단백질 발현량을 비교했다. 마찬가지로 mRNA는 정량을 통해 서로 동일한 양의 cDNA를 합성했으며, Syber green과 타겟 Primer를 토대로 qRT-PCR을 진행하여 Interferon receptor의 발현 정도를 정량 비교하였다.

[120] 실험결과 METI-101을 처리한 인간 암세포주에서 세포 표면 막 단백질인 Interferon receptor의 표현이 증가한 것으로 나타났다. 인간 암세포주에서 IFNAR1의 mRNA 발현은 크게 증가했으며 IFNAR2의 mRNA 또한 약 1.5~3배 증가한 것으로 확인되었다. 세 종류의 인간 암세포에서 IFNAR1과 IFNAR2의 단백질 발현도 Meti-101에 의해 증가하는 결과를 얻었다. Interferon receptor가 증가함으로써 Type I interferon의 신호전달의 강도가 강해지며 STING의 활성화로 이어져 피드백 작용을 통해 항종양 면역반응을 촉진시킬 수 있다(도 6).

[121] 종양세포 표면의 Type I interferon 신호전달 확인

[122] 락트산칼슘오수화물에 의한 종양세포내에서 면역반응도를 확인하기 위해 Type I interferon 신호전달(IRF7, MHC I)을 확인하였다. 인체 대장암, 유방암 및 췌장암 세포주에 대하여 RT-PCR과 면역자기영동(WB)로 확인하였다. 이를 통해 암세포의 Type I interferon 신호전달의 증가를 확인하고자 하였다.

[123] 사람의 대장암(HCT-116 및 HT29), 췌장암(AsPC-1), 유방암(MDA-MB-231) 세포주를 60mm cell culture dish에 각각 3.5×10^5 cells/well의 세포 수로 접종했다. 접종 후 세포의 안정화를 위해 24시간 동안 37°C5%CO₂ 조건에서 배양했다. 안정화된 세포들은 PBS로 세척한 후 10% FBS와 2.5mM의 Meti-101이 포함된 RPMI-1640배지에서 저 산소 조건(37°C5%CO₂, 1%O₂)으로 24시간 배양했다. 배

양된 세포는 단백질을 얻기 위해 RIPA buffer를 사용했으며, Trizol을 이용하여 mRNA를 추출했다. 추출한 단백질은 Protein assay를 통해 정량해서 단백질을 크기에 따라 분리한 후 Type I interferon 신호전달 단백질에 특이적인 항체를 붙여 단백질의 형광 정도를 확인함으로써 암세포에서 METI-101에 의한 IRF-7과 MHC I의 단백질 발현양을 비교했다. 마찬가지로 mRNA는 정량을 통해 서로 동일한 양의 cDNA를 합성했으며, Syber green과 타겟 Primer를 토대로 qRT-PCR을 진행하여 IRF-7의 mRNA 발현 정도를 정량 비교하였다.

- [124] Type I interferon의 신호 전달은 IRF-7이 매개하며, Meti-101을 처리했을 때 인간 암세포주의 IRF-7의 mRNA와 Protein의 발현이 증가함을 확인했다. IRF-7에 의한 신호전달의 결과로 세포 표면 항원 제시 인자인 MHC1의 단백질 발현 또한 증가하는 것을 확인했다 (도 7).
- [125] 종양세포 표면의 Type I interferon 신호전달에 의한 면역유도성 Chemokine 발현 확인
- [126] 락트산칼슘오수화물에 의한 종양세포내에서 면역반응도를 확인하기 위해 면역세포유도성 chemokine의 발현을 확인하였다. 인체 대장암, 유방암 및 췌장암 세포주에 대하여 RT-PCR과 면역자기영동(WB)로 CXCL-9, CXCL10의 mRNA와 단백질의 생성량을 확인하였다. 이를 통해 암세포의 면역유도성 Chemokine의 증가를 확인하고자 하였다.
- [127] 사람의 대장암(HCT-116), 췌장암(AsPC-1), 유방암(MDA-MB-231) 세포주를 60mm cell culture dish에 각각 3.5×10^5 cells/well의 세포 수로 접종했다. 접종 후 세포의 안정화를 위해 24시간 동안 37°C 5% CO₂ 조건에서 배양했다. 안정화된 세포들은 PBS로 세척한 후 10% FBS와 2.5mM의 Meti-101이 포함된 RPMI-1640배지에서 저 산소 조건(37°C 5% CO₂, 1% O₂)으로 24시간 배양했다. 배양된 세포는 단백질을 얻기 위해 RIPA buffer를 사용했으며, Trizol을 이용하여 mRNA를 추출했다. 추출한 단백질은 Protein assay를 통해 정량해서 단백질을 크기에 따라 분리한 후 Type I interferon 신호전달 단백질에 특이적인 항체를 붙여 단백질의 형광 정도를 확인함으로써 암세포에서 Meti-101에 의한 CXCL-9과 CXCL-10의 단백질 발현양을 비교했다. 마찬가지로 mRNA는 정량을 통해 서로 동일한 양의 cDNA를 합성했으며, Syber green과 타겟 Primer를 토대로 qRT-PCR을 진행하여 Chemokine의 mRNA 발현 정도를 정량 비교하였다.
- [128] 실험 결과 Meti-101에 의해 면역 활성화 단백질의 일종인 Chemokine의 분비가 증가하는 것을 확인했다. 인간 암세포주에서 CXCL-9과 CXCL-10의 mRNA 증가는 약 1.5배에서 4.5배까지 증가한다. Chemokine의 mRNA와 더불어 CXCL-10의 단백질 양도 증가하는 것을 확인했다. 결과적으로 METI-101의 처리한 인간 암세포는 면역 반응을 유도하여 면역계가 암세포에 예민하게 반응할 수 있다(도 8).
- [129] 종양세포 면역회피인자 발현 확인

- [130] 락트산칼슘오수화물에 의한 종양세포의 면역회피인자의 감소를 측정함으로써, 면역반응유도능을 확인하였다. 인체 대장암, 유방암 및 췌장암 세포주에 대하여 RT-PCR과 면역자기영동(WB)로 CD24와 CD47의 mRNA와 단백질의 생성량을 확인하였다. 이를 통해 암세포의 면역반응성이 증가함을 확인하고자 하였다.
- [131] 사람의 대장암(HCT-116), 췌장암(AsPC-1), 비소세포폐암(H1299) 세포주를 60mm cell culture dish에 각각 3.5×10^5 cells/well의 세포 수로 접종했다. 접종 후 세포의 안정화를 위해 24시간 동안 $37^\circ\text{C} 5\% \text{CO}_2$ 조건에서 배양했다. 안정화된 세포들은 PBS로 세척한 후 10% FBS와 2.5mM의 Meti-101이 포함된 RPMI-1640배지에서 저 산소 조건($37^\circ\text{C} 5\% \text{CO}_2$, 1% O_2)으로 24시간 배양했다. 배양된 세포는 단백질을 얻기 위해 RIPA buffer를 사용했으며, Trizol을 이용하여 mRNA를 추출했다. 추출한 단백질은 Protein assay를 통해 정량해서 단백질을 크기에 따라 분리한 후 면역회피인자 단백질에 특이적인 항체를 붙여 단백질의 형광 정도를 확인함으로써 암세포에서 Meti-101에 의한 CD24와 CD47의 단백질 발현양을 비교했다. 마찬가지로 mRNA는 정량을 통해 서로 동일한 양의 cDNA를 합성했으며, Syber green과 타겟 Primer를 토대로 qRT-PCR을 진행하여 면역회피인자의 mRNA 발현 정도를 정량 비교하였다.
- [132] CD24와 CD47은 면역 회피를 가능하게 만드는 막 단백질로 Meti-101을 인간 암세포주에 처리하면 CD24와 CD47이 유의미하게 감소하는 것을 확인했다. 실험에 사용된 인간 암세포주 모두 CD24와 CD47이 mRNA와 Protein에서 감소했다. Meti-101을 처리한 인간 암세포주는 CD24와 CD47을 감소로 인하여 항면역 반응이 제거되며 암세포에 대한 면역 감응도를 증가시켜준다(도 9).
- [133] 실시예 3. 종양미세환경에서의 면역억제인자들의 감소 및 면역세포의 접근성 확인
- [134] 혈관생성인자 VEGF 발현 및 혈관신생 억제 효과
- [135] 락트산칼슘오수화물에 의한 종양세포의 면역억제성 혈관생성인자 VEGF 발현 억제효과(도 12)와 혈관세포의 혈관생성 억제효과(도 10)를 확인하였다. 이것은 면역세포의 종양내로 진입을 억제하는 면역억제성 인자이다. 확인을 위해 인체 대장암세포 2종에 대하여 혈관생성인자 VEGF mRNA 발현양을 RT-PCR을 사용하여 측정하였다(도 12). 또한 인간 인간 제대 정맥 내피 세포(HUVEC)을 이용하여 혈관 신생정도를 확인하였다.
- [136] 사람 유래의 대장암 세포인 HCT-116를 60mm cell culture dish에 3.5×10^5 cells/well의 세포 수로 접종하였으며, 성장인자의 간섭을 피하기 위해 1%FBS로 24시간 동안 배양하였다. 24시간 배양 후 약물 효과를 확인하기 위해 2.5mM Meti-101을 처리하였다. 처리 24시간 후 일반 배양 조건과 Meti-101을 처리한 조건에서의 세포 배양액을 원심 필터 장치(Millipore)를 이용하여 수집하였다(Conditioned Media, CM). 인간 제대 정맥 내피 세포(HUVEC)를 96well 배양접시에 접종 후 세

포 배양액(CM)을 처리하였다. 다음 이 실험은 튜브 형성 분석 키트(Cultrex)를 사용하였으며, 형광 현미경을 통해 세포 형태의 용량 의존적 변화를 포착하였다.

[137] 그 결과 Meti-101를 처리하지 않은 HUVEC에서는 혈관신생이 잘 이루어지는 것을 확인할 수 있었지만 Meti-101를 처리한 HUVEC에서는 혈관신생이 안되는 것을 확인할 수 있었다 (도 10).

[138] 종양 활성화 섬유소세포의 생성 및 섬유화 억제 효과

[139] 종양 내부로 진입하는 면역세포를 막는 종양 활성화 섬유아세포의 생성과 이 세포에 의해 만들어지는 세포 외 기질(ECM) 및 분자 생물학적 마커를 정량하여, 면역 억제성 섬유아세포로 분화가 억제됨을 확인하였다. 실험을 통해 종양 표면의 단단한 섬유 생성을 저해하여 면역세포의 종양 내 진입을 용이하게 하는가를 확인했다. 이를 위해 인간 섬유아세포 2종을 이용하여 종양 활성화 섬유아세포로 변환을 확인하였으며, 각종 인자의 단백질 발현량을 면역자기영동(WB)으로 확인하였다.

[140] 사람의 정상 폐 세포주(MRC-5 및 WI-38)를 60mm cell culture dish에 각각 3.5×10^5 cells/well의 세포 수로 접종했다. 접종 후 세포의 안정화를 위해 24시간 동안 37°C 5% CO₂ 조건에서 배양했다. 전처리를 위해 PBS로 세척한 후 10% FBS와 5ng/ml의 TGF-β가 포함된 DMEM배지에서 추가적으로 8시간 배양했다. 전처리가 끝나고 FBS가 없는 DMEM배지에서 5ng/ml의 TGF-β와 2.5mM의 Meti-101을 처리한 후 저 산소 조건(37°C 5% CO₂, 1% O₂)으로 24시간 배양했다. 배양된 세포는 RIPA buffer로 모아서 단백질을 추출했다. 추출한 단백질은 Protein assay를 통해 정량해서 단백질을 크기에 따라 분리한 후 섬유화 관련 항체를 붙여 단백질의 형광 정도를 확인함으로써 암세포에서 Meti-101에 의한 세포 외 기질 및 섬유아세포 분화의 단백질 발현양을 비교했다.

[141] 저 산소 조건에서 HIF-1α의 발현이 섬유아세포에서도 증가하는 것을 확인했다. Meti-101은 저 산소 조건에서 암세포뿐만 아니라 섬유아세포에서 또한 HIF-1α의 발현을 감소시킨다. 저 산소 조건의 섬유아세포에 TGF-β를 처리하여, TGF-β수용체와 신호 전달 단백질인 Smad2의 인산화를 단백질 면역 블롯을 통해 확인한 결과, METI-101에 의해 Smad2의 인산화가 감소하며, 세포 표면의 TGF-β수용체 또한 감소한다. 마찬가지로 섬유아세포에서 저 산소 조건과 TGF-β처리하는 섬유화의 마커인 α-SMA, Col1a1과 Fibronectin의 발현을 증가하는 것을 알 수 있다. Meti-101은 섬유화를 유발하는 세포 외 기질 단백질의 합성을 농도 의존적으로 감소시켜 종양의 섬유화를 저해할 수 있다 (도 11).

[142] 암세포의 면역억제인자 TGF-β생성억제효과 확인

[143] 종양내부에서의 암세포를 공격하는 면역세포의 활성을 억제하고, 면역억제성 면역세포의 활성을 증강시키는 TGF-β생성을 확인함으로써, 락트산칼슘오수화물에 의한 면역억제성 종양미세환경의 변화를 확인하였다. 이를 위해 인체 대장암, 폐암, 췌장암, 유방암유래 암세포를 이용하여 이들로부터 생성되는 TGF-β단백질 발현량을 면역자기영동(WB)로 확인하였다.

- [144] 사람의 대장암(HCT-116), 췌장암(AsPC-1), 비소세포폐암(H1975) 그리고 유방암(MDA-MB-231) 세포주를 60mm cell culture dish에 각각 3.5×10^5 cells/well의 세포 수로 접종했다. 접종 후 세포의 안정화를 위해 24시간 동안 $37^\circ\text{C} 5\% \text{CO}_2$ 조건에서 배양했다. 안정화된 세포들은 PBS로 세척한 후 10% FBS와 2.5mM의 Meti-101이 포함된 RPMI-1640배지에서 저 산소 조건($37^\circ\text{C} 5\% \text{CO}_2, 1\% \text{O}_2$)으로 24시간 배양했다. 배양된 세포는 RIPA buffer로 모아서 단백질을 추출했다. 추출한 단백질은 Protein assay를 통해 정량해서 단백질을 크기에 따라 분리한 후 TGF- β 에 특이적인 항체를 붙여 단백질의 형광 정도를 확인함으로써 암세포에서 Meti-101에 의한 TGF- β 의 단백질 발현양을 비교했다.
- [145] Meti-101을 처리한 인간 암세포주는 TGF- β 의 단백질 합성이 감소하는 것을 확인했다. TGF- β 의 감소로 종양 내부의 미세 환경이 변하게 되어 면역 세포의 기능 저하가 일어나지 않아 정상적으로 암세포를 공격할 수 있다(도 12).
- [146]
- [147] 암세포의 면역억제성 화학물질의 생성억제효과 확인
- [148] 종양내부에서의 암세포를 공격하는 면역세포의 활성을 억제하는 화학물질인 lactate, proton 등의 생성을 확인하기 위해 세포내 lactate의 농도 및 세포내 pH의 변화를 측정하였다. 이를 위해 인체 대장암 HCT-116 세포주를 사용하였으며 형광학적 세포분석과 효소적인 lactate 정량, 색소에 의한 pH의 측정을 하였다. 이를 통해 락트산칼슘오수화물에 의한 면역억제성 화학물질의 생성 저해 효과를 확인하였다.
- [149] 세포 내 lactate의 농도를 측정하기 위해 HCT-116세포를 5×10^5 cells/well의 농도로 60mm 세포배양 접시에 접종하였으며 37°C 에서 24시간 배양하였다. 배양 후 세포를 RPMI1640배지에서 Meti-101를 24시간 동안 처리하였다. 이어서 세포를 DPBS를 사용하여 세척 및 수집하였고, 세포 및 배양액을 균질화 후 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질은 BCA 정량법을 이용하여 단백질 농도를 측정하였다. Lactate 농도는 분광광도법으로 측정하고 총 단백질로 정규화 했으며, 샘플 용액을 실온에서 30분 동안 반응제와 함께 배양하였다. 이어서 샘플의 흡광도를 마이크로플레이트 분광광도계를 이용하여 450nm에서 측정하였다. 위 실험은 Lactate Assay Kit(Abcam)을 이용하여 분석 및 실험을 진행하였다. 위 실험 방법과 같은 방법으로 세포내 pH농도를 측정하기 위한 샘플을 수집하였다. 수집된 샘플은 pH-sensitive pHrodo TM Red AM (Molecular Probes; Thermo Fisher Scientific)을 이용하여 배양하였다. 배양 후 형광은 555-580nm파장에서 측정 및 분석되었고, nigericin calibration curve를 사용하여 세포 내 pH농도로 변환되었다.
- [150] 그 결과 세포 내 lactate의 농도는 Meti-101을 처리하였을 때 유의성 있게 증가된 것을 알 수 있었으며, 세포 내 pH 농도는 Meti-101을 처리한 조건에서 유의있게 감소된 것을 확인할 수 있었다(도 13).
- [151] 암세포에서 면역억제성 면역관문 단백질의 발현억제 효과 확인

- [152] 암세포 표면에 발현되어 면역세포의 종양 공격을 방해하고, 면역세포의 사멸, 피로를 유도하는 면역억제성 면역관문 단백질의 발현양을 측정하였다. EGFR의 일반형과 변이형을 발현하고 있는 주가지의 인체 폐암 유래 암세포에서 대표적인 면역관문 단백질인 PD-L1의 양을 면역형광방법으로 확인하였으며, 이를 통해 락트산칼슘오수화물에 의한 면역억제성 면역관문 단백질의 생성 저해 효과를 확인하였다.
- [153] 사람 유래 폐암세포 A549(EGFR wild type) 와 H1975(EGFR mutant type)에서 bio-coated cover slip에 3×10^3 접종한 뒤 암세포가 안정적으로 정착이 되면 2.5mM의 Meti-101을 처리하고 정상 산소 조건 그리고 저 산소 조건(37°C 5% CO_2 , 1% O_2)으로 24시간 배양하였다. 배양 후 각 세포들을 포르말린 용액을 이용하여 고정시킨 후 PD-L1 항체로 결합시키고 2차 항체를 이용하여 형광을 표현하게 하였다. 이 과정이 거치고 slide에 세포를 올려 공초점 현미경으로 570-620nm 파장으로 관찰하였다.
- [154] A549 와 H1975 폐암 세포주에서 Meti-101를 처리한 세포들은 처리하지 않은 세포에 비하여 크게 PD-L1이 감소되는 것을 정상 산소 조건과 저 산소 조건에서 확인하였다 (도 14).
- [155] 실시예 4. In Vivo 면역 약리 효과
- [156] 대장암 이식모델에서의 종양내 면역억제성 VEGF 발현 억제와 혈관신생 억제
- [157] 사람 유래 세포인 HCT-116을 이용한 Xenograft 모델에서 실험 종료 후 부검시 종양을 적출하여 실험을 진행하였다. 적출된 종양은 반으로 자른 후 반은 포르말린에 고정을 하였고, 나머지 반은 RIPA buffer를 넣은 후 균질화 및 BCA 방법을 이용하여 단백질을 추출 및 정량화하였다. 추출된 단백질은 전기연동장치를 이용하여 면역자기영동(WB)로 실험을 진행하였으며, ImageJ 프로그램을 이용하여 밴드 정량 및 대표적인 이미지로 데이터화하였다. 고정된 종양은 파라핀블록 제작 후 cryo section을 통하여 슬라이드를 제작하였으며, 제작된 슬라이드는 CD31 항체를 이용하여 Hematoxylin and Eosin(H&E)염색 및 면역형광법(Immunofluorescence)을 진행하였다.
- [158] 그 결과 Meti-101을 처리한 마우스에서 종양세포가 많이 감소한 것을 알 수 있었으며(H&E), 면역형광법 결과에서는 CD31이 크게 감소한 것을 확인할 수 있었다 (도 15).
- [159] 중간엽줄기세포(MSC)와의 병용에 의한 항암면역 및 면역기억 효과
- [160] 1)중간엽 줄기세포(MSC)와의 병용에 의한 항종양 활성 효과 확인
- [161] Meti-101의 약리효과를 탐색하기 위하여 마우스 유래의 대장암 세포인 MC-38를 이용하여 Xenograft 모델을 대조군(10마리), 중간엽 줄기세포(10마리), 중간엽 줄기세포와 Meti-101의 병용투여(10마리) 3개의 그룹으로 준비하였다. 마우스 옆 구리에 MC-38 세포주 1×10^5 을 피하투여하였으며, 종양 세포 투여 후 7일차부터

실험 종료일까지 주 2회, 종양 발생 확인(촉진) 및 electric caliper를 사용하여 종양의 장축 및 단축 크기를 측정하였다.

[162] 종양크기(mm^3) = (장축) x (단축²) / 2

[163] 중간엽 줄기세포는 종양내 투여 방법으로 하루에 2번씩 총 3일간 5번 1×10^6 세포를 접종하였으며, Meti-101은 20mg/kg 피하주사 방법으로 매일 2번씩 접종하였다. 투여 후 10일 이후부터는 중간엽 줄기세포 및 병용투여 군에서 종양크기가 크게 감소를 하였으며 30일 이후에는 중간엽 줄기세포군에서 9마리가 종양이 관찰되지 않았으며, 병용투여군에서는 10마리 모두 종양이 없어지는 것을 관찰하였다(도 16).

[164] 2)중간엽 줄기세포(MSC)와의 병용에 의한 항종양 면역기억 효과 확인

[165] 도 16의 실험을 바탕으로 중간엽 줄기세포와의 병용에 의한 항종양 면역기억 효과 확인을 위해 re-challenge 실험을 진행하였다.

[166] 대조군은 동물윤리법에 의하여 안락사 시켰으며, 중간엽 줄기세포군에서 9마리 병용투여군에서 10마리 그리고 새로운 대조군 10마리를 준비하여 총 29마리로 재실험을 진행하였다. 중간엽 줄기세포군과 병용투여군은 15일간 휴식기간을 거친 후 마우스 대장암 세포주인 MC-38을 1×10^5 을 대조군(10마리), 중간엽 줄기세포군(9마리), 병용투여군(10마리)에 재 접종하였다.

[167] 종양 세포를 투여한 후 종양크기를 측정한 결과 대조군의 종양의 부피가 가장 크게 성장하였으며, 중간엽 줄기세포군에서는 살짝 감소하는 경향을 보였다. 병용투여군에서는 4마리가 종양이 성장하였지만 크기가 크지 않았으며, 6마리의 마우스에서 첫 종양 측정일부터 종료일까지 종양의 성장이 전혀 관찰되지 않았다. 중간엽 줄기세포군과 병용투여군에서 유의성을 확인할 수 있었다(도 17).

[168] 종양측정 종료 후 마우스는 부검을 진행하였다. 비장에서의 면역관련인자 White pulp를 확인하기 위하여 비장을 적출하였다. 비장을 적출 후 10%포르말린에 고정 후 파라핀블록을 제작하였다. 마이크로톰을 이용하여 슬라이드를 제작하였으며, 제작된 슬라이드는 H&E 염색을 진행하였다. 각 그룹간의 비장을 비교하였을 때 병용투여군에서 White pulp가 크게 증가한 것을 알 수 있었다. White pulp는 하얀색 글씨 WP로 기재하였다(도 18).

[169] Re-challenge 실험을 통하여 Tumor volume 과 White pulp의 상관관계를 확인하기 위하여 면역 분포도를 작성하였다(도 19). 빨간 동그라미가 나타낸 면역화된 개체들은 종양이 관찰되지 않은 개체이며 White pulp가 더욱 증가한 분포이다. 또한 종양크기가 증가할수록 White pulp가 작은 것을 확인할 수 있었다.

[170] Peptide vaccine 와의 병용투여에 의한 항종양 활성화 효과 확인

[171] Meti-101의 약리효과를 탐색하기 위하여 마우스 유래의 폐암 세포인 TC-1-Luc를 이용하여 Xenograft 모델을 대조군(10마리), Meti-101(10마리), peptide vaccine(10마리), peptide vaccine 와 Meti-101의 병용투여(10마리) 4개의 그룹으로 준비하였다. 마우스 옆구리에 TC-1-Luc 세포주 1×10^5 을 피하투여 하였으며, 종

양 세포 투여 후 종양크기가 150mm³일 때부터 실험 종료일까지 주 2회, 종양 발생 확인(촉진) 및 electric caliper를 사용하여 종양의 장축 및 단축 크기를 측정하였다.

[172] 종양크기(mm³) = (장축) x (단축²) / 2

[173] Meti-101은 20mg/kg 피하 투여 방법으로 2주간 매일 2번씩 접종하였으며, peptide vaccine는 6일 간격으로 근육 주사 방법으로 투여하였다. 투여 후 7일 후부터 대조군에 대비하여 peptide vaccine와 병용투여 그룹에서 종양 크기의 차이가 벌어졌으며, 12일 후부터는 대조군과 Meti-101의 종양 크기가 차이나는 것을 확인할 수 있었다(56%). 15일 이후부터는 peptide vaccine와 병용투여군에서 종양 크기가 크게 감소하는 것을 확인하였다(61%) (도 20).

[174] IL-7와 Meti-101 병용투여에 의한 항종양 활성 효과 확인

[175] Meti-101의 약리효과를 탐색하기 위하여 마우스 유래의 대장암 세포인 MC-38를 이용하여 Xenograft 모델을 대조군(10마리), Meti-101(10마리), IL-7 (10마리), IL-7 와 Meti-101의 병용투여(10마리) 4개의 그룹으로 준비하였다. 마우스 옆구리에 MC-38 세포주 1x10⁵을 피하투여 하였으며, 종양 세포 투여 후 7일 후부터 실험 종료일까지 주 2회, 종양 발생 확인(촉진) 및 electric caliper를 사용하여 종양의 장축 및 단축 크기를 측정하였다.

[176] 종양크기(mm³) = (장축) x (단축²) / 2

[177] Meti-101은 20mg/kg 피하 투여 방법으로 2주간 매일 2번씩 접종하였으며, IL-7는 종양 세포 투여 7일 후 근육 주사 방법으로 한번 투여하였다. 투여 후 7일 후부터 IL-7와 Meti-101 그룹에서 종양 크기의 차이가 벌어졌으며, 10일 후부터는 대조군, IL-7, Meti-101 그룹에서 종양크기가 증가하였지만 대조군은 대부분 500 ~ 1000mm³까지 종양이 자랐으며, IL-7에서는 500 ~ 1000mm³까지 자라면서도 크게 감소하는 개체들을 확인할 수 있었다. Meti-101 또한 위 두 그룹과 마찬가지로 증가하였다. 병용투여 그룹에서는 종양크기가 3그룹에 비해 크게 감소한 것을 확인하였다. 실험종료 시점에서는 대조군 그룹에서는 500 ~ 2000mm³까지 골고루 분포가 되었으며, IL-7그룹에서는 300~2000mm³까지 골고루 분포한 것을 확인하였다. Meti-101 그룹에서는 500 ~ 1500mm³에서 분포하였지만 1500mm³ 이상인 종양은 관찰되지 않았다. 병용투여 그룹에서는 300 ~ 1000mm³까지 골고루 분포하면서 종양크기가 크게 감소한 것을 알 수 있었다(도 21)

[178] 실시예 5: 칼슘락테이트에 의한 세포자멸괴사 현상

[179] 10% FBS 및 1% 페니실린/스트렙토마이신을 포함하는 RPMI1640, FBS가 포함되어 있지 않은 무혈청 RPMI1640 배지 그리고 2.5mM의 칼슘락테이트를 처리한 무혈청 RPMI1640 배지에 HCT116 대장암 세포주를 37°C 5% CO₂ 및 1% O₂ 조건에서 2시간 동안 배양했다. 배양을 완료한 후에 광학 현미경을 이용하여 세포 사진을 얻었다.

- [180] 도 22 내지 24는 10% FBS가 포함된 배지에서 배양된 대장암 세포 사진(도 22), 무혈청 배지에서 배양된 대장암 세포 사진(도 23), 2.5mM 칼슘락테이트가 처리된 무혈청 배지에서 배양한 대장암 세포 사진(도 24)이다. 혈청의 유무는 저 산소 조건에서 2시간 배양에 있어서 차이가 없음을 확인했다. 2.5mM 칼슘락테이트가 함유된 무혈청 배지에서 배양된 대장암 세포는 세포자멸괴사가 일어났음을 알 수 있었다.
- [181] 실시에 6: 조성에 따른 칼슘락테이트에 의한 세포자멸괴사 현상
- [182] HCT-116 대장암 세포주를 무혈청 RPMI1640 배지와 2.5mM 칼슘락테이트를 처리한 무혈청 RPMI1640 배지에서 37°C 5% CO₂ 및 1% O₂ 조건과 37°C 5% CO₂ 조건으로 2시간 동안 배양했다. 배양이 끝난 후 대장암 세포를 확인하기 위해 광학현미경으로 사진을 찍었다. 2.5mM 칼슘락테이트를 처리한 무혈청 RPMI1640 배지에서 세포자멸괴사가 일어났음을 확인하기 위해 배지를 걷어내고 식염수로 1회 세척 후 trypsin-EDTA 1ml을 처리하여 1분간 배양 후 대장암 세포를 떨어뜨렸다. 대장암 세포는 식염수 1ml로 모아서 엔펜도르프 튜브에 옮겨 담았다. 멍쳐 있는 대장암 세포를 풀어주고 세포 현탁액 10ul와 trypan blue 10ml을 섞어주어 염색했다. 염색된 대장암 세포 현탁액 10ml을 혈구계수판에 넣고 살아있는 세포 수를 측정했다.
- [183] 상기 조건으로 실험을 진행했을 때, 2.5mM 칼슘락테이트가 포함된 무혈청 배지의 대장암 세포는 일반적인 배양 조건(도 25 우상단)과 저산소 조건(도 25 우하단)에 관계없이 세포자멸괴사가 일어났다. 2.5mM 칼슘락테이트가 없는 무혈청 배지에서 배양된 대장암 세포는 일반적인 배양 조건(도 25 좌상단)과 저산소 조건(도 25 좌하단)에서 모두 살아있었다. 대조군과 비교하여 2.5mM 칼슘락테이트가 처리된 대장암 세포는 어느정도 살아있는지 trypan blue 염색법을 통해 측정된 결과 99% 이상의 대장암 세포가 죽었음을 알 수 있었다(도 26).
- [184] 위 결과를 통해 대기의 조건에 관계 없이 무혈청 배지에 2.5mM 칼슘락테이트를 처리하면 거의 모든 대장암 세포를 세포자멸괴사로 유도할 수 있음을 확인했다.
- [185] 실시에 7: 칼슘락테이트와 대표적인 암세포 배양 배지에 따른 세포자멸괴사 현상
- [186] 대장암 세포인 HCT-116을 암세포 배양에 주로 사용되는 3종류의 배지(DMEM, IMEM 그리고 RPMI1640)에 무혈청 조건으로 2.5mM의 칼슘락테이트를 처리하여 배양했다. 37°C, 5% CO₂ 및 1% O₂ 조건으로 2시간 동안 배양을 하고 세포자멸괴사를 보기 위해 광학현미경으로 사진을 찍었다. 대장암세포의 사멸을 수치화하기 위해 배지를 걷어내고 식염수로 1회 세척 후 trypsin-EDTA 1ml을 처리하여 1분간 배양 후 대장암 세포를 떨어뜨렸다. 대장암 세포는 식염수 1ml로 모아서 ep튜브에 옮겨 담았다. 멍쳐 있는 대장암 세포를 풀어주고 세포 현탁액 10ul와 trypan blue 10ml을 섞어주어 염색했다. 염색된 대장암 세포 현탁액 10ml을 혈구계수판에 넣고 살아있는 세포 수를 측정했다.

- [187] 도 27은 HCT-116 대장암 세포주를 2.5mM 칼슘락테이트가 포함된 무혈청 DMEM, IMEM, RPMI1640 배지에서 2시간 동안 배양한 결과 RPMI1640 배지에서 세포자멸괴사를 확인했다(도 27 오른쪽). DMEM과 IMEM에 2.5mM 칼슘락테이트를 처리할 경우 대장암 세포의 세포자멸괴사는 일어나지는 않는다(도 27 왼쪽, 도 27 가운데).
- [188] 도 28에서 3종류의 배지에 따른 대장 암세포의 세포자멸괴사 정도를 비교하기 위해 혈구 계수기를 이용하여 살아있는 대장암 세포의 개수를 측정하고 그래프로 나타내었다. 2.5mM 칼슘락테이트를 처리한 무혈청 DMEM과 IMEM 배지에서 배양된 살아있는 대장암 세포의 수는 1ml당 100만개 전후 수준으로 살아있는 세포가 측정되었지만, RPMI1640 배지에서 배양된 살아있는 세포의 양은 1ml당 4000개 수준으로 유의미하게 감소함을 알 수 있었다. 위 실험을 통해 칼슘락테이트는 RPMI1640 배지에서 특이적으로 암세포의 세포자멸괴사를 일으키는 것을 확인할 수 있다.
- [189] 실시에 8:무혈청 RPMI1640배지에서 METI-101의 처리로 인한 인간 대장암 세포의 면역 인자 활성화
- [190] 인간 대장암 세포인 HCT-116을 Welgene에서 판매하는 무혈청 RPMI1640 배지에 배양을 하고 METI-101을 처리했다. 시간 변화에 따른 실험에서 METI-101의 농도는 2.5mM로 처리되었으며, 농도 변화에 따른 실험에서 배양 시간은 1시간으로 두었다. 세포 외부로 분비되는 단백질(IFN α , GM-CSF, IL-1 β)은 세포 배양액으로 효소 결합 면역 흡착제 분석을 진행했다. 세포 내 신호전달 단백질과 막 단백질은 세포의 총 단백질을 모아 면역 블롯을 진행했다. 마지막으로 면역 반응의 핵심 역할을 하는 인터페론 패밀리를 실시간 중합효소 연쇄반응을 이용해 분자 생물학적 수준에서 확인했다.
- [191] 세포가 분비하는 인터페론 알파는 무혈청 배지에서 METI-101 2.5mM에 1시간 동안 노출되었을 때 METI-101이 없는 세포보다 2배 정도 더 많이 분비가 되었다.(도 29 왼쪽 첫번째) 인터페론을 인식하는 막관통 수용체인 IFNAR1 또한 1시간에서 mRNA의 발현 수준이 유의미하게 증가했다.(도 31 왼쪽 첫번째) IFNAR1과 이종이량체를 이루는 IFNAR2의 mRNA 발현 수준은 높아지지 않았지만, 세포 내 단백질이 1시간에서 유의미하게 증가했다.(도 31 왼쪽 두번째, 도 30 왼쪽 첫번째) 뿐만 아니라 인터페론과 항염증성 사이토카인을 촉진시키는 STING 단백질의 인산화가 일어나 활성형태로 바뀌게 되며, 항원제시 단백질인 주조직 적합성 복합체 1(MHC class1)의 단백질 수준이 올라감을 확인했다.(도 30 왼쪽 첫번째, 도 30 오른쪽)
- [192] 무혈청 배지에서 METI-101 2.5mM의 처리로 인해 STING이 인산화 되며, 인터페론의 합성이 증가하는 것을 IFN α 와 IFN β 의 mRNA 합성량을 통해 알 수 있으며, 무혈청 배지에서 METI-101과 함께 2시간 동안 배양을 진행하면 인터페론 mRNA 합성이 2배 증가했다.(도 31 왼쪽 세번째, 왼쪽 네번째, 왼쪽 다섯번째)

- [193] METI-101을 인간 암세포에 농도 의존적으로 처리를 했을 때, 백혈구의 성장인자로 기능을 하는 과립구 대식세포 콜로니 자극인자(GM-SCF)와 면역을 촉진시키는 IL-1 β 의 단백질 분비량이 METI-101 2.5mM부터 유의미하게 증가하기 시작했다.(도 29 왼쪽 두번째, 왼쪽 세번째)
- [194] 무혈청 배지에 METI-101을 2.5mM이상 처리한 암세포에서는 세포 내 STING 신호전달로 인터페론과 항염증성 사이토카인을 만들어 분비하며, 항원 표지와 인터페론 수용체를 증가시켜 면역 반응을 활성화시킨다.
- [195] 실시예 9: 무혈청 RPMI1640배지에서 농도에 따른 METI-101의 처리로 인한 종양 연관 항원 제시 및 암세포 사멸에 의한 바이오 마커의 감소
- [196] 인간 대장암 세포인 HCT-116, 인간 췌장암 세포인 AsPC-1 그리고 인간 비소 세포성 폐암을 Welgene에서 판매하는 무혈청 RPMI1640 배지에 배양을 하고 METI-101을 농도에 따라 처리했다. 배양시간은 1시간으로 고정시켜서 진행했으며, 1시간동안 암세포가 특징적으로 생성하는 종양 연관 항원 단백질(TSPAN8)과 종양 마커(CA9)를 세포 배양액에서 효소 결합 면역 흡착제 분석을 진행했다.
- [197] 종양 연관 항원 제시 단백질인 TSPAN8은 HCT-116세포에 METI-101 2.5mM을 처리하는 조건에서 매우 높은 수준으로 증가하며, METI-101 5.0mM을 처리했을 때는 절반 정도 감소하지만 대조군과 비교하면 여전히 높은 수치를 유지하고 있었다.(도 32 왼쪽 첫번째) AsPC-1 세포와 H1299세포는 HCT-116과는 다르게 낮은 농도인 METI-101 1.5mM부터 TSPAN8의 발현을 매우 높은 수준으로 유지시켰다. HCT-116과 동일한 점은 농도가 높아질수록 종양 연관 항원 제시 단백질의 분비가 감소하였다.(도 32 왼쪽 두번째, 왼쪽 세번째)
- [198] 암세포는 그 종류와 특징에 따라 특정 단백질이나 효소의 수준을 높게 혹은 낮게 유지한다. CA9 효소는 대표적인 종양 마커 중 하나로 사용된다. 인간 대장암 세포인 HCT-116에서 높은 수준의 CA9이 발현되고 있었으며, METI-101을 처리했을 때 암세포의 세포자멸괴사가 일어나 세포 배양액에서 CA9이 감소하는 것을 확인했다.(도 33 왼쪽 첫번째) H1299세포는 HCT-116과 같은 패턴으로써 METI-101이 처리되면 세포자멸괴사로 인해 CA9의 분비가 METI-101 1.5mM부터 빠르게 감소했으며, AsPC-1세포는 농도 의존적으로 CA9이 감소했다.(도 33 왼쪽 두번째, 세번째)
- [199] 위 결과로 무혈청 배지에서 METI-101을 처리하면 CA9 결과를 통해 종양세포가 사멸됨과 동시에 종양 연관 항원인 TSPAN8을 제시한다.
- [200] 실시예 10: 무혈청 RPMI1640배지에서 농도에 따른 METI-101의 처리로 인한 손상 연관 분자 유형(DAMP, Damage-associated molecular pattern)의 분비와 면역원성 세포사(ICD, Immunogenic Cell Death)
- [201] 인간 대장암 세포인 HCT-116을 Welgene에서 판매하는 무혈청 RPMI1640 배지에 배양을 하고 METI-101을 농도에 따라 처리했다. 배양시간은 1시간으로 고정시켜서 진행했으며, 면역원성 세포사로 분류되는 세포 자멸괴사는 손상연관분자유형을 나타낸다. 이 실험에서는 손상 연관 분자 유형을 세포배양액에서 확인

했다. 핵산 형태 손상 연관 분자 유형인 DNA는 실리카 흡착법을 이용한 키트로 분리하였으며, RNA와 dsRNA는 TRI 용액을 이용하여 분리했다. DNA와 RNA는 미량 분광광도계(Nanodrop)로 정량을 진행하고 dsRNA는 효소 결합 면역 흡착제 분석법으로 정량 했다.

- [202] 다른 형태의 손상 연관 분자 유형들은 효소 결합 면역 흡착제 분석법을 이용 했다. 세포 배양액에서 핵산을 분리한 결과 무혈청 배지에 METI-101 2.5mM을 1시간 처리했을 때부터 배양액 속 DNA와 RNA가 증가했다.(도 34 왼쪽 첫번째, 두번째) 무혈청 배지에 METI-101 2.5mM을 1시간 처리하여 dsRNA를 정량 했을 때, 대조군과 비교하여 높은 수준의 dsRNA가 배지에 존재함을 확인했다.(도 34 왼쪽 세번째) 핵산을 제외한 손상 연관 분자 유형으로는 단백질인 HMGB1, Calreticulin 그리고 HSP90을 효소 결합 면역 흡착제 분석법으로 확인했고, 세포 배양 배지의 Calreticulin과 HSP90은 1.5mM부터 유의미한 증가가 일어났다.(도 35 왼쪽 두번째, 세번째) HMGB1은 METI-101 1.5mM에서 증가하는 경향성이 보이지만 유의미한 차이는 나오지 않았으며, METI-101 2.5mM에서 대조군 대비 높은 수준으로 증가했다.(도 35 왼쪽 첫번째) 마지막으로 유기분자인 ATP는 비색법(Colorimetry)를 이용하여 정량을 진행했다. 낮은 농도인 METI-101 1.5mM부터 대조군 대비 유의미한 차이를 보였으며 농도의존적으로 세포 배양액 속 ATP의 양이 증가했다.(도 35 왼쪽 네번째)
- [203] 세포 배양액 속 손상 연관 분자 유형 정량을 통해 METI-101은 암세포의 세포자멸괴사를 일으키는 것을 확인했다. 또한 세포자멸괴사로 인해 세포 내부 물질들이 세포 밖으로 나와 특이적 생체분자를 제공함으로써 면역 반응을 유도해 면역원성 세포사로 포함된다. 이 손상 연관 분자 유형들은 면역세포의 패턴 인식 수용체(PRRs, Pattern-recognition receptors)에 정보를 전달하여 암세포에 대한 전반적인 면역을 향상시킨다.
- [204] 실시예 11: 인간 대장암 세포인 HCT-116을 이중 이식한 쥐에서 종양 내 주사 방법을 통한 METI-101의 세포자멸괴사 유도
- [205] 누드마우스에 인간 대장암 세포주인 HCT-116세포를 피하주사로 넣어 종양을 형성시켰다. 종양은 무혈청 RPMI1640배지와 METI-101을 섞어 54mM로 만들고 인슐린 주사기를 이용해서 즉시 종양 내 주사를 했다. 동물 실험 종료 후, 종양 조직은 세포자멸괴사의 마커인 인산화된 MLKL을 면역조직화학법으로 염색했다. (도 36 위)
- [206] METI-101을 주사하지 않은 조직은 인산화된 MLKL이 나타나지 않으며 암세포들이 정상적으로 자리하고 있다.(도 36 아래, 왼쪽 첫번째) METI-101이 직접 주사된 조직 주변은 사멸세포들이 자리하고 있으며, 인산화된 MLKL이 진하게 염색이 된다. 조직이 붕괴되어 직접적이고 빠르게 종양의 크기감소가 일어나는 부분이다.(도 36 아래, 왼쪽 두번째) 직접 주사된 영역의 주변 부위 또한 MLKL이 인산화 되어 염색이 되어 있음을 확인할 수 있다. 주변 부위는 사멸진행세포로 천

- 천히 죽어가며, 면역 반응을 더욱 증강시키는 역할을 한다.(도 36 아래, 왼쪽 세번째)
- [207] 이 동물 실험을 통해 METI-101의 종양 내 직접 주사방법은 주사 부위의 빠른 세포 사멸과 함께 주변 영역까지 사멸을 유도해서 전체적인 종양 크기의 감소와 면역원성 세포사의 효과를 나타낸다.
- [208] 실시에 12: 인간 대장암 세포인 HCT-116을 이종 이식한 쥐에서 종양 내 주사 방법을 통한 METI-101의 세포 사멸괴사와 림프구 모집
- [209] 실시예 11 결과로 조직 염색법 중 하나인 헤마토실린-에오신 염색을 통해 조직을 염색했다. 촬영된 조직은 METI-101이 직접 주사된 부분으로 사멸세포들이 모여 있는 부분이다. 도 29에서 보여지는 METI-101처리시 GM-CSF 증가하는 결과와 함께 종양 내 사멸세포 주변에는 림프구들이 모여 있음을 알 수 있다.(도 29 왼쪽 두번째, 도 37)
- [210] 실시에 13: 대장암종 세포주인 CT26을 동종 이식한 쥐에서 종양 내 주사 방법을 통한 METI-101의 세포사멸괴사 유도 및 표준 방사선 치료와 병용효과
- [211] METI-101을 직접 주사하여 세포사멸괴사를 유도했을 때, 앞의 실시예를 근거로, 암세포에 대한 시스템 적인 면역이 성공적으로 완성이 되었는지 알아보는 실험을 진행했다. 쥐 유래 대장암종인 CT26세포를 쥐 피부 아래에 피하주사로 동종 이식을 하여 종양을 형성시켰다. 형성된 종양은 표준 방사선 치료법과 METI-101 직접 투여 방법을 각각 혹은 동시에 진행했다. 방사선 치료법은 높은 조사량으로 1회 진행을 했으며, METI-101 종양 내 직접 주사 방법은 2주 동안 4회를 주사했다. 1회
- [212] 주사에는 무혈청 배지에 METI-101 54mM의 농도가 투여됐다.(도 38 위) 상기 실험 과정을 거친 후 모든 쥐들은 종양을 제거하는 수술을 했다. 수술 후에 약간의 회복 기간을 두고 모든 쥐들에 CT26세포를 처음과 같은 세포 수로 피하주사를 진행했다. 2주동안 종양이 형성되는지 모니터링을 하며 종양이 형성되는 유무를 확인했다.(도 38 아래)
- [213] 실시에 14: 대장암종 세포주인 CT26을 동종 이식한 쥐에서 종양 내 주사 방법을 통한 METI-101의 세포사멸괴사 유도 및 표준 방사선 치료와 병용효과
- [214] 실시예 13의 실험방법을 따라 동물 실험을 진행한 결과, 대조군과 RPMI1640을 종양 내 직접 주사해준 군은 암세포가 정상적으로 자라 평균 2~2.5mm³의 종양을 형성했다. 반면에 표준 방사선 치료를 진행한 군은 암세포의 크기가 평균 0.56mm³의 크기로 유의미하게 감소했다. 무혈청 배지에 METI-101 54mM을 종양 내 직접 주사해준 군은 종양 크기가 평균 0.22mm³으로 표준 방사선 치료법보다 종양 크기가 더 작게 나타났다. 두 치료법을 같이 적용한 군은 종양의 크기가 평균 0.02mm³수준으로 작아진 것을 확인할 수 있다.(도 39 왼쪽 그림의 왼쪽 사진과 그래프)

- [215] 면역원성 세포사인 세포자멸괴사를 확인하기 위해 종양 조직을 면역조직화학법으로 인산화된 MLKL을 염색했다. 표준 방사선 치료를 적용한 종양에서 MLKL의 인산화는 일어나지 않았다. METI-101을 주사한 종양은 MLKL의 인산화가 확실하게 확인되었다. 두 치료법을 같이 적용하면 암세포가 사멸하여 구멍이 뚫려 있으며 남아있는 세포에서는 MLKL의 인산화가 일어나고 있었다.(도 39 왼쪽 그림의 오른쪽 사진)
- [216] 다시 CT26세포를 주사했을 때, 대조군과 RPMI1640배지를 주사해준 군에서 모든 쥐는 종양이 형성되었다. 표준 방사선 치료법 또는 METI-101 종양 내 직접 주사를 진행한 군에서 모든 쥐는 종양이 형성되지 않았다.(도 39 오른쪽 그래프)
- [217] 표준 방사는 치료법과 METI-101 종양 내 직접 주사 모두 종양의 크기가 획기적으로 감소했으며, 동시에 적용할 경우 종양이 없어질 정도로 줄어들었다. 앞선 실시예와 같이 METI-101은 세포 자멸괴사를 통해 면역을 활성화 시키고 종양의 크기를 줄이며, 면역기억을 통해 재발을 방지한다.
- [218] 실시예 15: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{NaHCO}_3$ 용액과 RPMI1640에서 METI-101에 의한 세포자멸괴사
- [219] 인간 대장암 세포인 HCT-116을 증류수에 녹인 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{NaHCO}_3$ 용액에 METI-101 2.5mM을 처리하여 세포자멸괴사를 확인했다. 음성 대조군으로 PBS와 PBS에 METI-101 2.5mM을 처리했으며, 양성 대조군으로 Welgene사의 RPMI1640에 METI-101 2.5mM을 처리했다. 실험군은 RPMI1640의 조성과는 같은 몰 농도로 증류수에 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{NaHCO}_3$ 을 녹인 용액과 증류수에 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{NaHCO}_3$ 을 녹여 pH를 7.4로 맞춘 용액으로 선정하여 METI-101 2.5mM을 처리했다. 약물이 처리된 세포는 2시간 동안 저산소 조건에서 배양되었다. 탁도 또한 METI-101 2.5mM을 처리하여 660nm 파장에서 측정했다.
- [220] 처리 전과 비교해서 PBS를 단독으로 처리한 암세포는 바닥에서 모두 떠 있었으며 PBS에 METI-101 2.5mM을 처리한 암세포는 삼투압이 맞아 바닥에 붙어 있는 현상을 보였다.(도면 40 위) Welgene사의 RPMI1640에 METI-101 2.5mM을 처리한 암세포는 앞선 실시예와 동일하게 세포 자멸괴사가 일어났다.(도면 40 아래 왼쪽 첫번째) 증류수에 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{NaHCO}_3$ 을 녹인 용액과 증류수에 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{NaHCO}_3$ 을 녹여 pH를 7.4로 맞춘 용액에 METI-101 2.5mM을 처리해 준 결과 Welgene사의 RPMI1640과 동일한 현상이 나타났다.(도면 40 아래 왼쪽 두번째, 세번째)
- [221] 세포 자멸괴사가 유도되어 세포의 죽음이 확실한지 확인하기 위해 trypan blue 염색을 살아있는 세포 수 측정을 진행했다. PBS와 PBS에 METI-101 2.5mM을 처리해준 대조군은 유의미한 차이가 없는 수치가 나왔으며, 양성 대조군과 실험군에서 차이를 보였다. RPMI1640보다 증류수에 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{NaHCO}_3$ 을 녹인 용액에 METI-101 2.5mM을 처리해 주었을 때 세포자멸괴사가 조금 더 유도되는 것을 확인할 수 있으며, pH를 조정해 주었을 때 대부분의 세포를 사멸시키는 것을 알 수

있다.(도 41 위) RPMI1640에 METI-101을 처리했을 때 나타나는 특징 중 하나인 탁도 또한 증류수에 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{NaHCO}_3$ 을 녹인 용액에서 동일한 수준의 탁도를 나타냈다.(도 41 아래)

청구범위

- [청구항 1] a) 칼슘 락테이트 및
b) 인산염, 줄기세포, 사이토카인, 암 세포주, 상기 암세포주 유래 항원, 상기 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드가 프로모터에 작동가능하게 연결된 항원 유전자 컨스트럭트, 및 상기 유전자 컨스트럭트를 포함하는 발현벡터로 구성된 균으로부터 선택된 하나 이상의 물질을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 암세포주 유래 항원은 종양특이항원 (tumor specific antigen, TSA) 또는 종양연관항원 (tumor associated antigen, TAA)이고, 상기 사이토카인은 IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-21 및 GM-CSF로 구성된 균으로부터 선택된 하나 이상의 사이토카인이며, 상기 인산염은 제1인산나트륨(Monosodium Phosphate)인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.
- [청구항 3] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 조성물은 탄산염을 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.
- [청구항 4] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 조성물에서, 칼슘 락테이트는 2.5mM 내지 54mM, 상기 인산염은 5mM 이상인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.
- [청구항 5] a) 칼슘 락테이트 및
b) 인산염, 줄기세포, 사이토카인, 암 세포주, 상기 암세포주 유래 항원, 상기 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드가 프로모터에 작동가능하게 연결된 항원 유전자 컨스트럭트, 및 상기 유전자 컨스트럭트를 포함하는 발현벡터로 구성된 균으로부터 선택된 하나 이상의 물질을 유효성분으로 포함하는 암 치료용 약학 조성물.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 암세포주 유래 항원은 종양특이항원 (tumor specific antigen, TSA) 또는 종양연관항원 (tumor associated antigen, TAA)이고, 상기 사이토카인은 IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-21 및 GM-CSF로 구성된 균으로부터 선택된 하나 이상의 사이토카인이며, 상기 인산염은 제1인산나트륨(Monosodium Phosphate)인 것을 특징으로 하는 암치료용 약학 조성물.
- [청구항 7] 제5항 또는 제6항에 있어서, 상기 조성물은 상기 조성물은 탄산염을 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 암 치료용 약학 조성물.
- [청구항 8] 제5항 또는 제6항에 있어서, 상기 조성물에서, 칼슘 락테이트는 2.5mM 내지 54mM, 상기 인산염은 5mM 이상인 것을 특징으로 하는 암 치료용 약학 조성물.
- [청구항 9] 제5항에 있어서, 상기 암은 대장암, 폐암, 위암, 신경교종, 간암, 흑색종, 신장암, 요로상피암, 두경부암, 메르켈세포종(Merkel-cell carcinoma), 전립선암, 혈액암, 유방암, 결장암, 직장암, 췌장암, 뇌암, 난소암, 방광암, 기관지

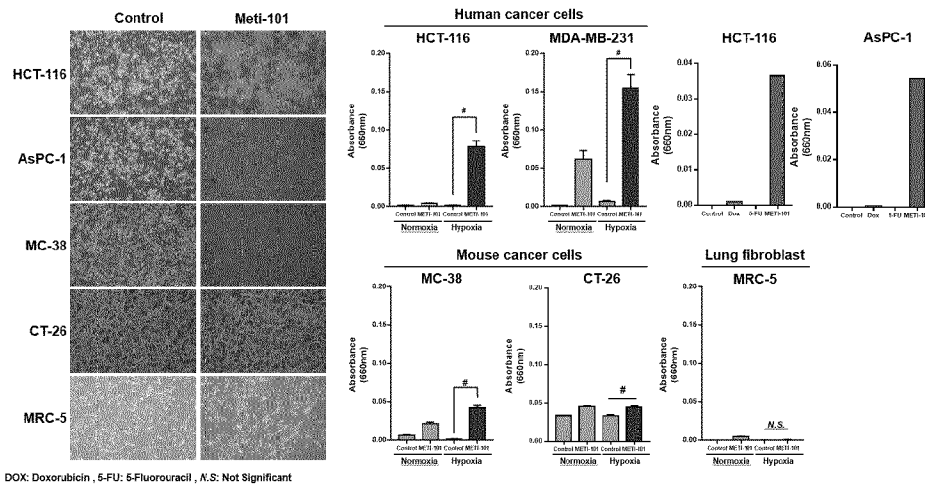
암, 피부암, 자궁경부암, 자궁내막암, 식도암, 갑상선암, 골암 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 암인 것인 특징으로 하는 암 치료용 약학 조성물.

- [청구항 10] a) 칼슘 락테이트 및
b) 인산염, 줄기세포, 사이토카인, 암 세포주, 상기 암세포주 유래 항원, 상기 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드가 프로모터에 작동가능하게 연결된 항원 유전자 컨스트럭트, 및 상기 유전자 컨스트럭트를 포함하는 발현벡터로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 물질을 유효성분으로 포함하는 암 백신 조성물.
- [청구항 11] 제10항에 있어서, 상기 암세포주 유래 항원은 종양특이항원 (tumor specific antigen, TSA) 또는 종양연관항원 (tumor associated antigen, TAA)이고, 상기 사이토카인은 IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-21 및 GM-CSF로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 사이토카인이며, 상기 인산염은 제1인산나트륨(Monosodium Phosphate)인 것을 특징으로 하는 암백신 조성물.
- [청구항 12] 제10항 또는 제11항에 있어서, 상기 조성물은 탄산염을 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 암 백신 조성물.
- [청구항 13] 제10항 또는 제11항에 있어서, 상기 조성물에서, 칼슘 락테이트는 2.5mM 내지 54mM, 상기 인산염은 5mM이상인 것을 특징으로 하는 암 백신 조성물.
- [청구항 14] 제10항 또는 제11항에 있어서, 상기 조성물은 종양내 투여(intratatumoral injection)되는 것을 특징으로 하는 암 백신 조성물.
- [청구항 15] 제10항에 있어서, 상기 암은 대장암, 폐암, 위암, 신경교종, 간암, 흑색종, 신장암, 요로상피암, 두경부암, 메르켈세포종(Merkel-cell carcinoma), 전립선암, 혈액암, 유방암, 결장암, 직장암, 췌장암, 뇌암, 난소암, 방광암, 기관지암, 피부암, 자궁경부암, 자궁내막암, 식도암, 갑상선암, 골암 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 암인 것인 특징으로 하는 암 백신 조성물.
- [청구항 16] a) 칼슘 락테이트 및
b) 인산염, 줄기세포, 사이토카인, 암 세포주, 상기 암세포주 유래 항원, 상기 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드가 프로모터에 작동가능하게 연결된 항원 유전자 컨스트럭트, 및 상기 유전자 컨스트럭트를 포함하는 발현벡터로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 물질을 유효성분으로 포함하는 조성물을 암 질환을 가지는 대상에 투여하는 것을 포함하는 암의 치료 또는 예방 방법.
- [청구항 17] 제16항에 있어서, 상기 암세포주 유래 항원은 종양특이항원 (tumor specific

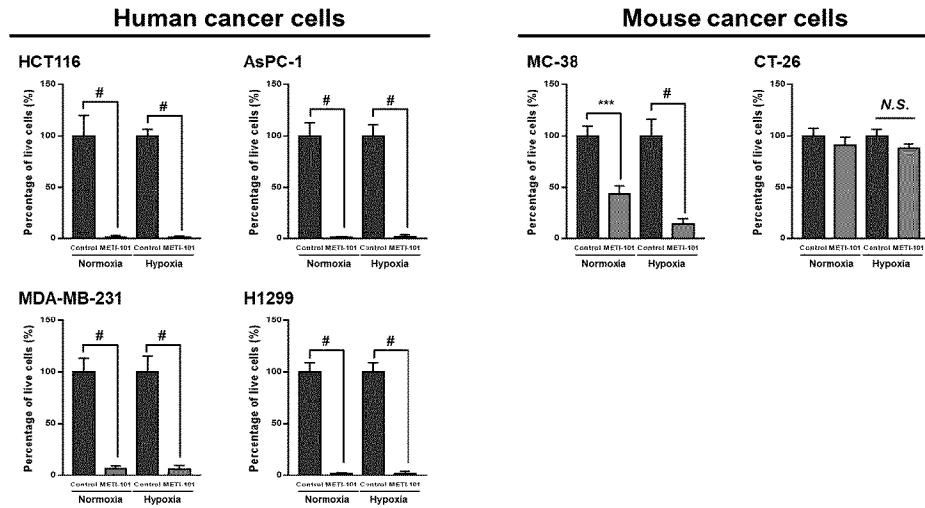
antigen, TSA) 또는 종양연관항원 (tumor associated antigen, TAA)이고, 상기 사이토카인은 IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-21 및 GM-CSF로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 사이토카인이며, 상기 인산염은 제1인산나트륨(Monosodium Phosphate)인 것을 특징으로 하는 암의 치료 또는 예방 방법.

- [청구항 18] 제16항 또는 제17항에 있어서, 상기 조성물은 탄산염을 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 암의 치료 또는 예방 방법.
- [청구항 19] 제16항 또는 제17항에 있어서, 상기 조성물에서, 칼슘 락테이트는 2.5mM 내지 54mM, 상기 인산염은 5mM 이상인 것을 특징으로 하는 암의 치료 또는 예방 방법.
- [청구항 20] 제16항 또는 제17항에 있어서, 상기 조성물은 종양내 투여(intratatumoral injection)되는 것을 특징으로 하는 암의 치료 또는 예방 방법.
- [청구항 21] 제16항에 있어서, 상기 암은 대장암, 폐암, 위암, 신경교종, 간암, 흑색종, 신장암, 요로상피암, 두경부암, 메르켈세포종(Merkel-cell carcinoma), 전립선암, 혈액암, 유방암, 결장암, 직장암, 췌장암, 뇌암, 난소암, 방광암, 기관지암, 피부암, 자궁경부암, 자궁내막암, 식도암, 갑상선암, 골암 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 암인 것을 특징으로 하는 암의 치료 또는 예방 방법.

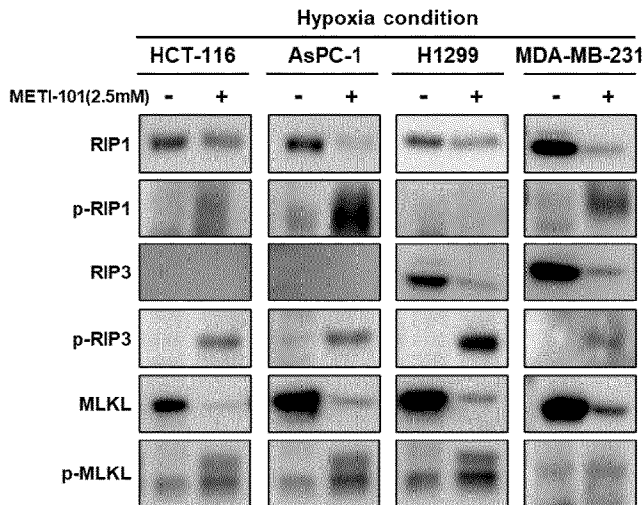
[도 1]



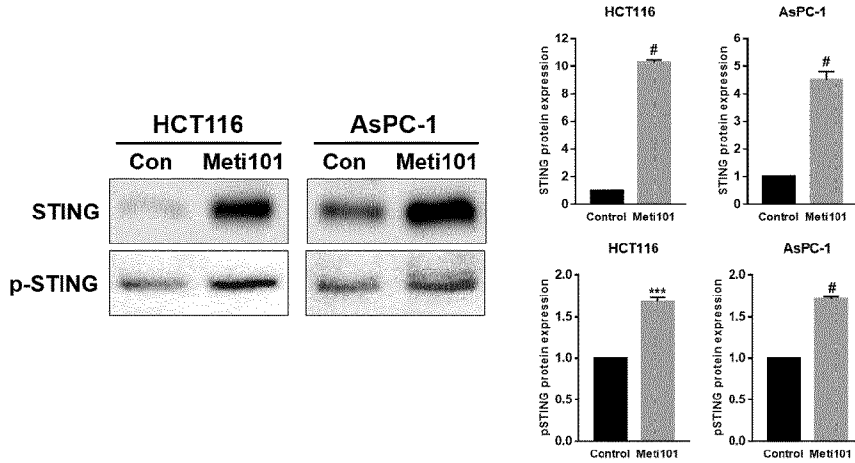
[도 2]



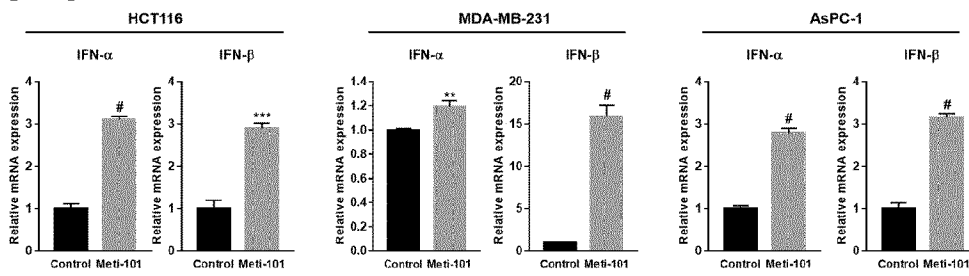
[도 3]



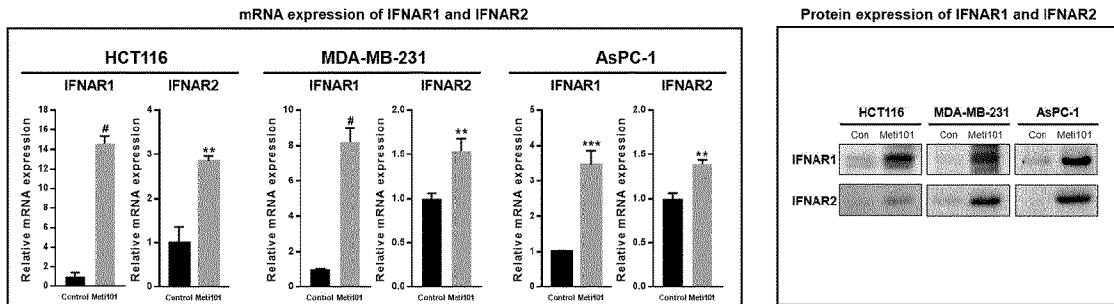
[도4]



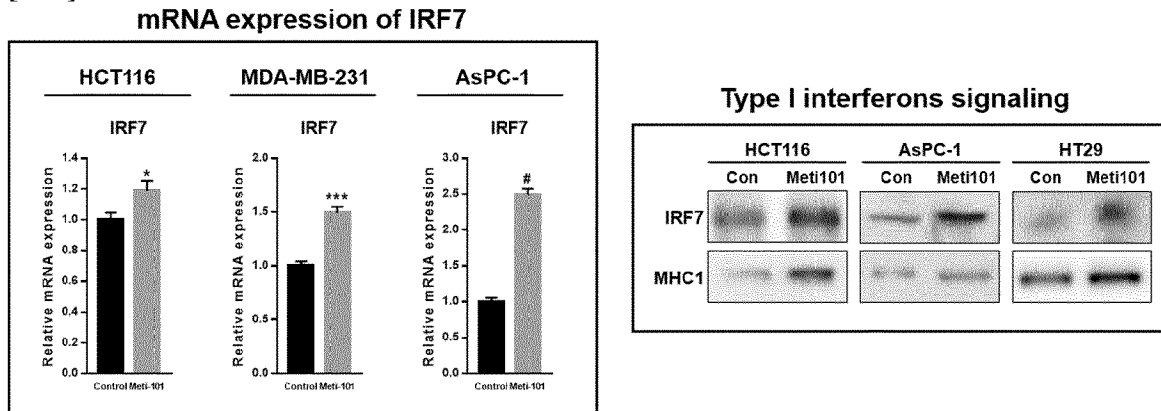
[도5]



[도6]

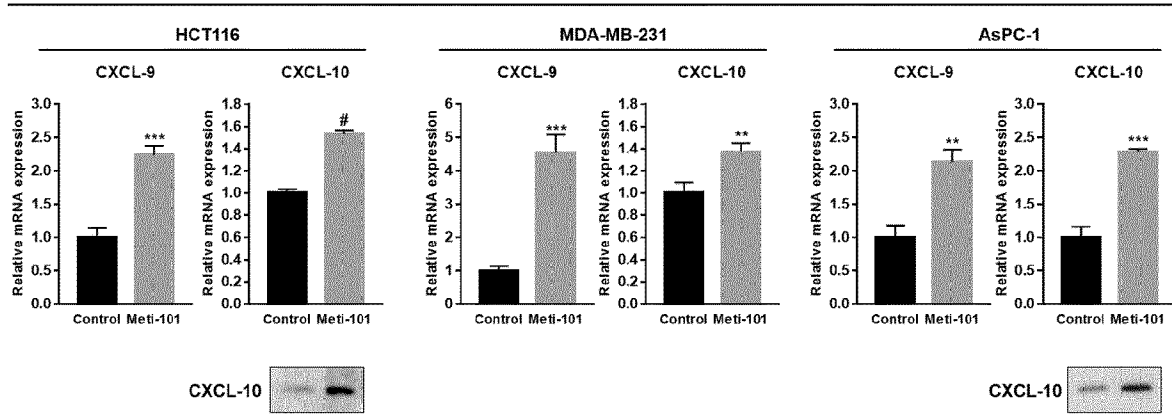


[도7]



[도8]

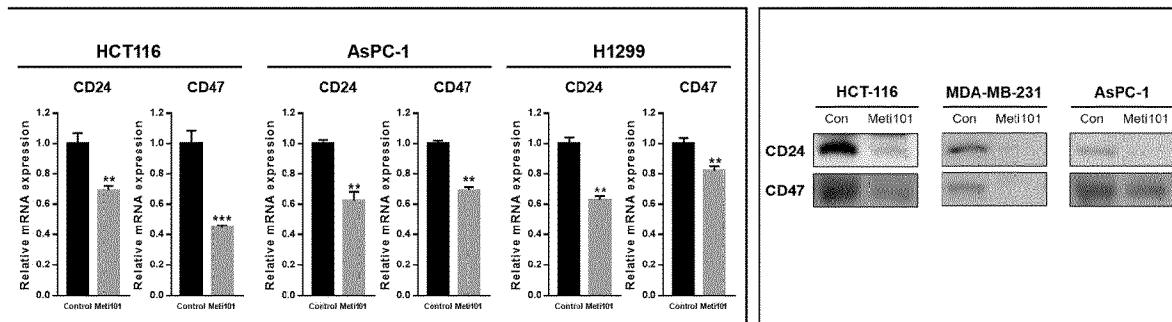
mRNA and protein expression of CXCL-9 and CXCL-10



[도9]

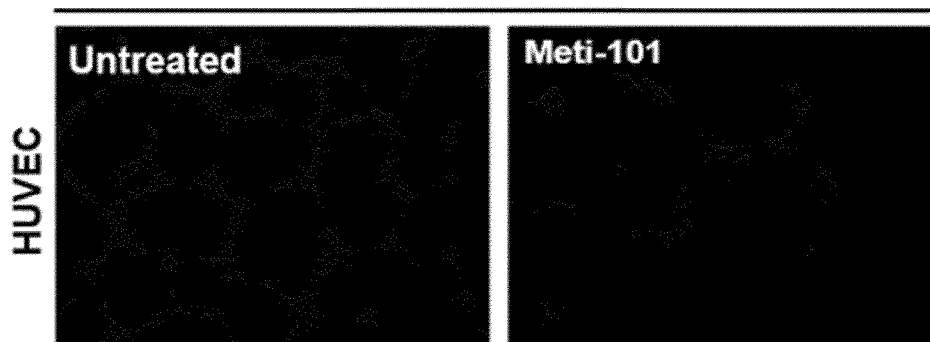
mRNA expression of CD24 and CD47

Protein expression of CD24 and CD47

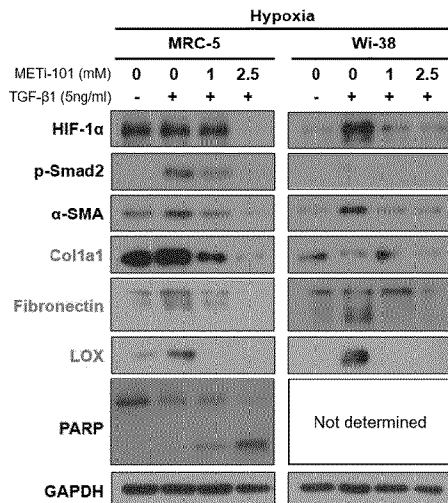


[도10]

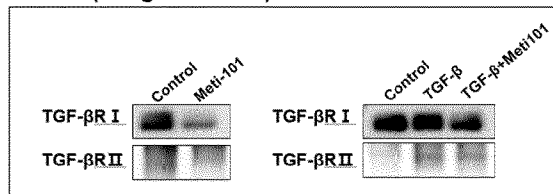
Tube formation



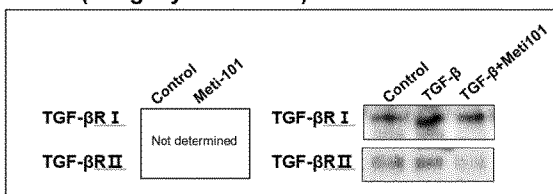
[도11]



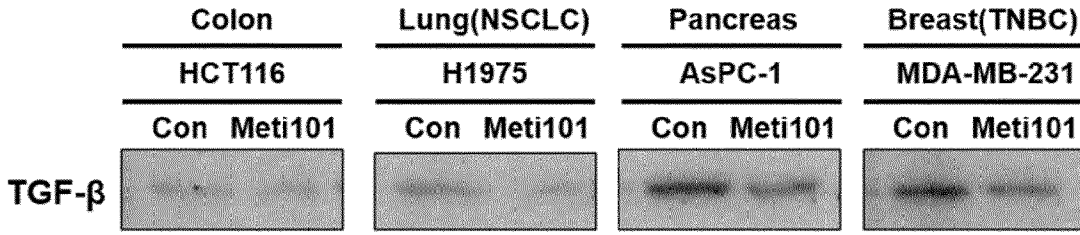
MRC-5(Lung fibroblast)



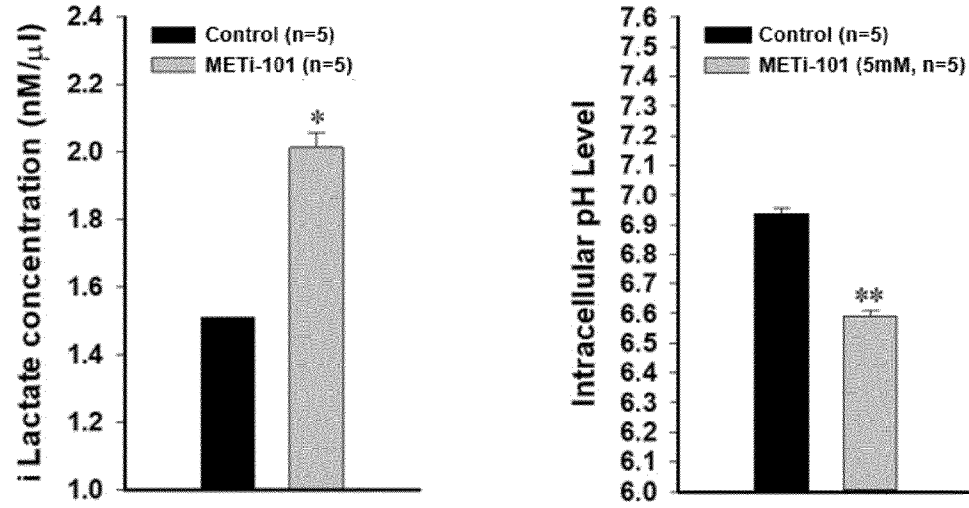
LL97a(Lung myofibroblast)



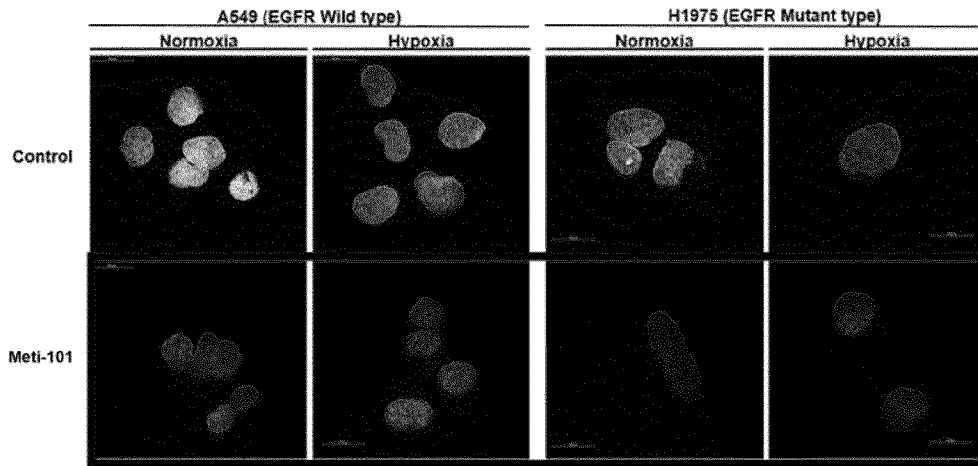
[도 12]



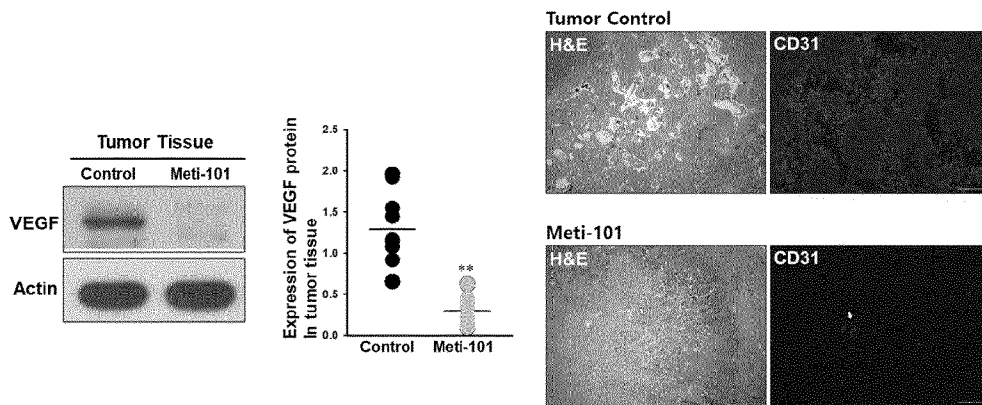
[도 13]



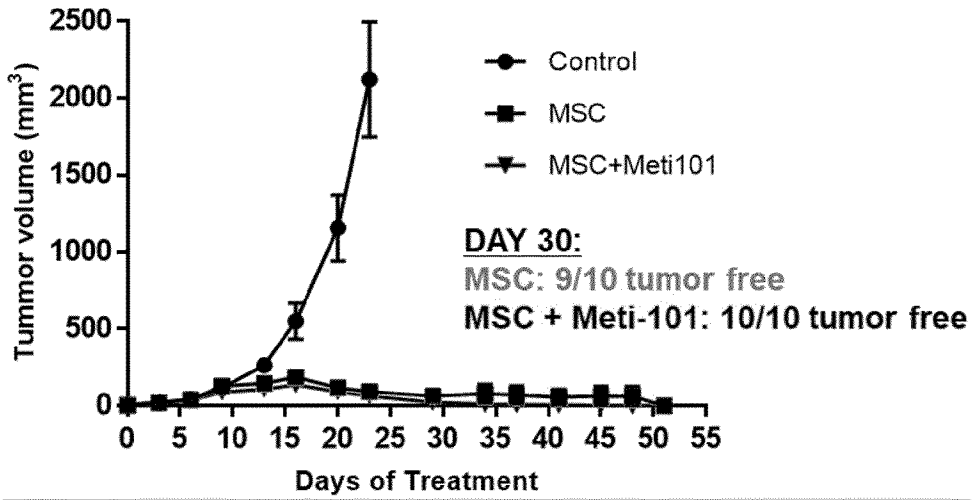
[도 14]



[도 15]

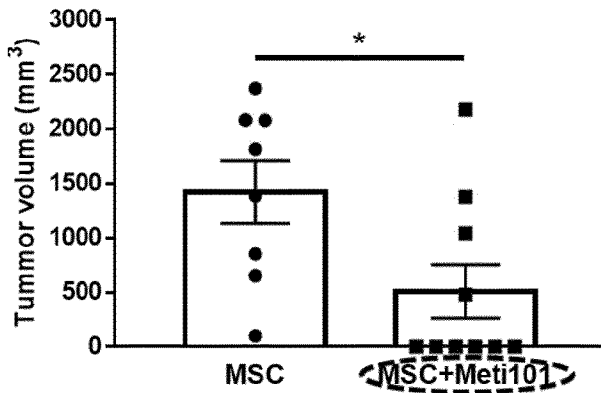


[도16]

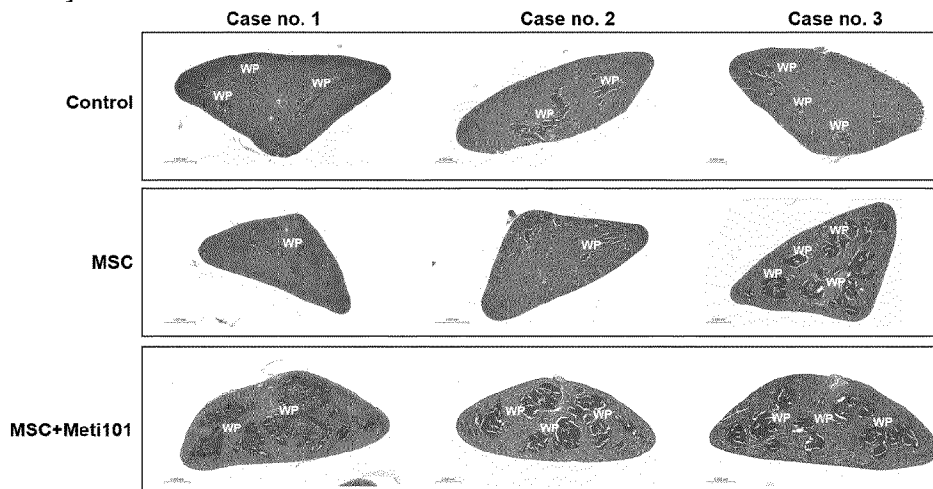


[도17]

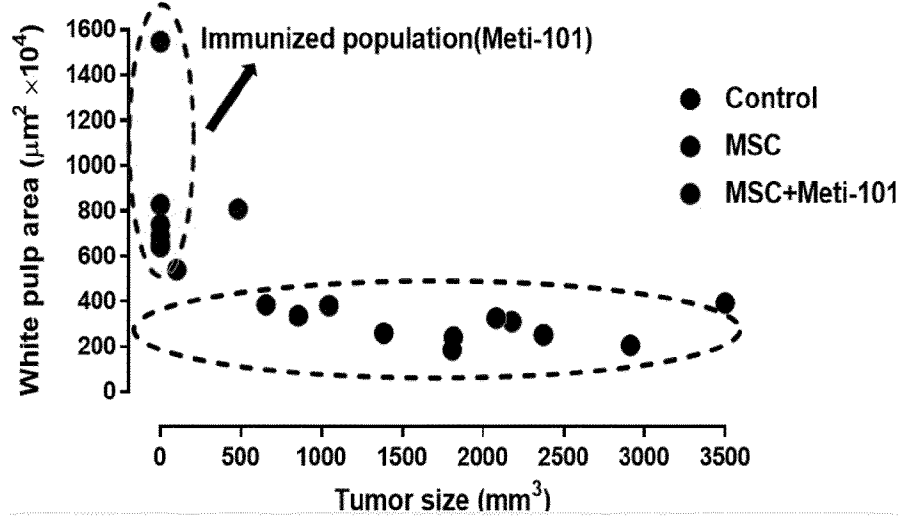
DAY 74:
 MSC: 0/9 tumor free and 1 mouse died
 MSC + Meti-101: 6/10 tumor free



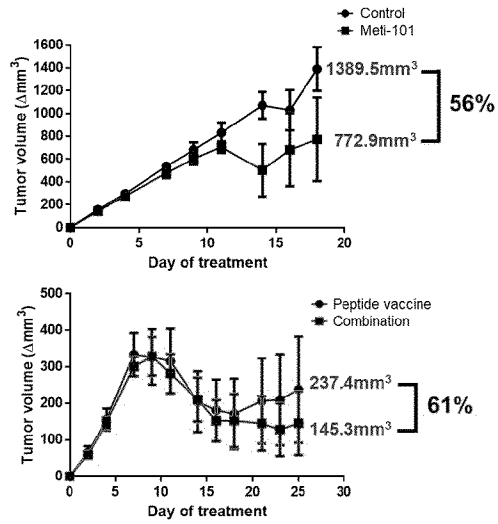
[도18]



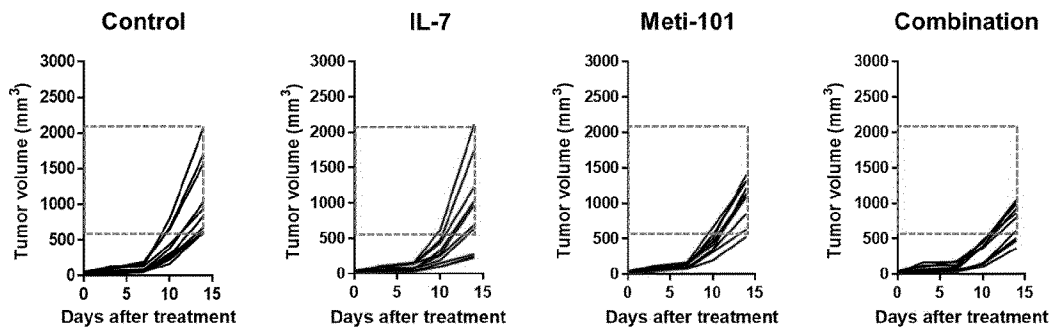
[도19]



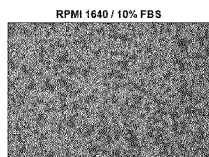
[도20]



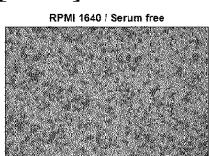
[도21]



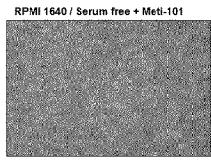
[도22]



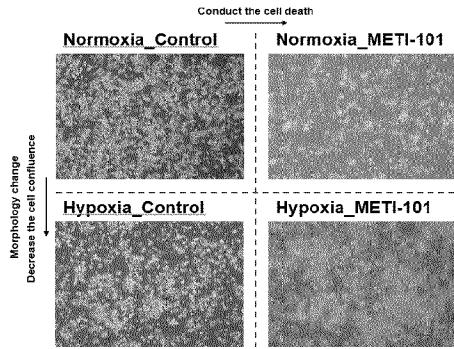
[도23]



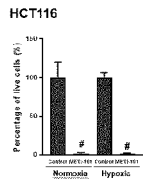
[도24]



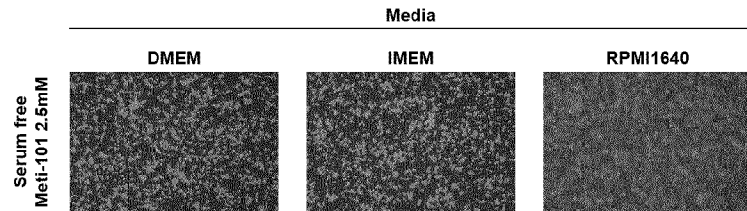
[도25]



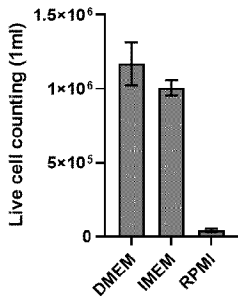
[도26]



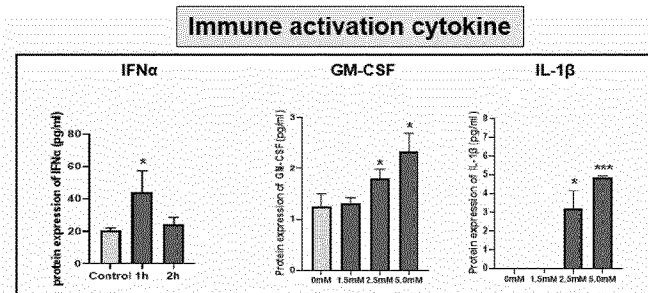
[도27]



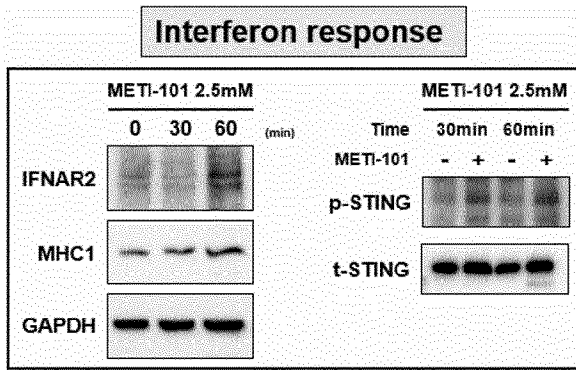
[도28]



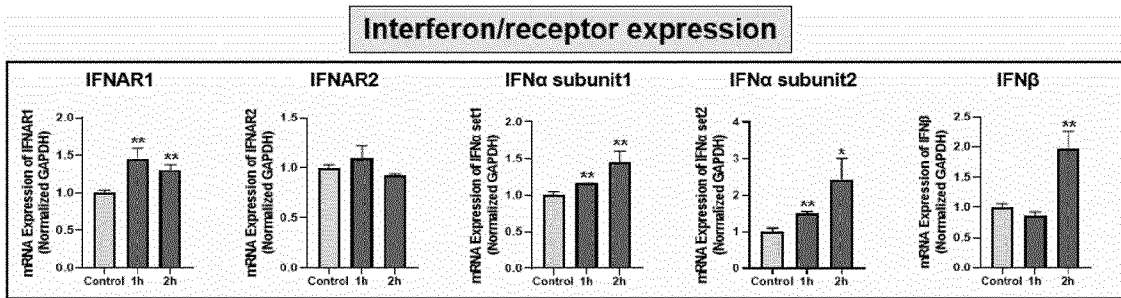
[도29]



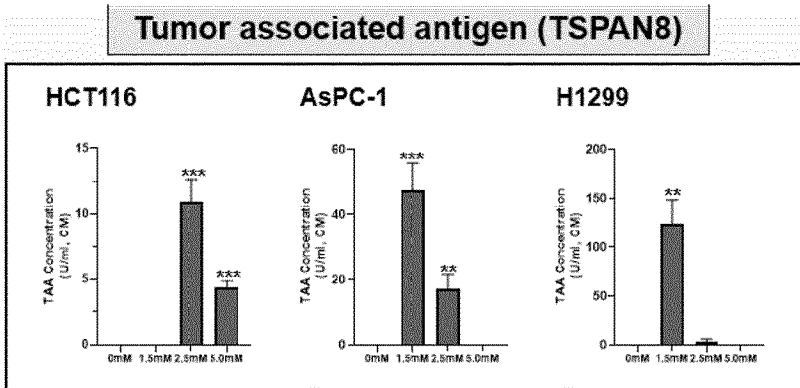
[도30]



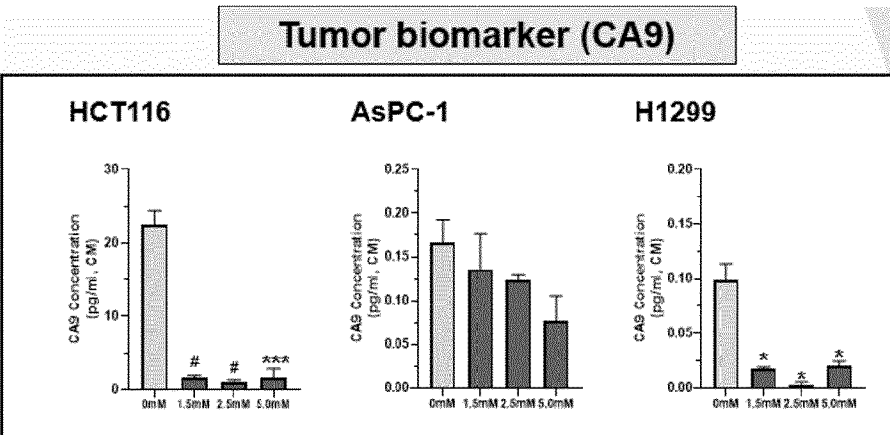
[도31]



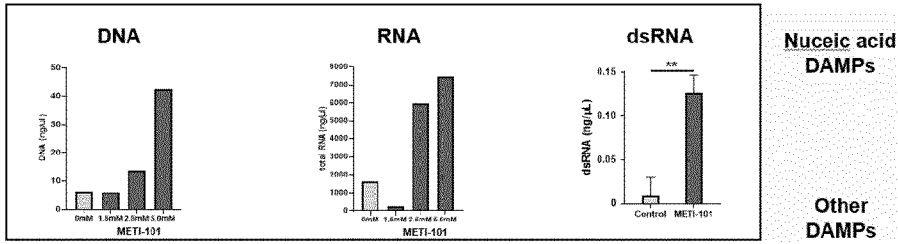
[도32]



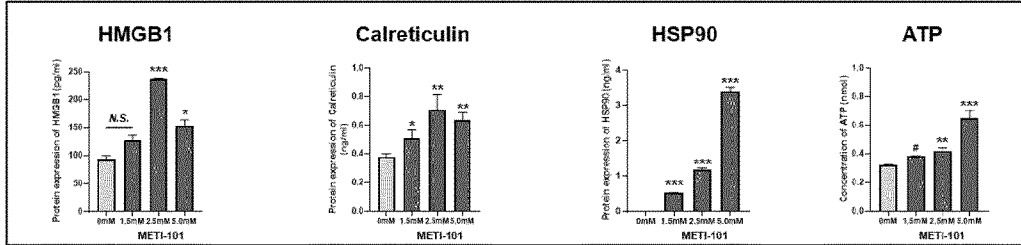
[도33]



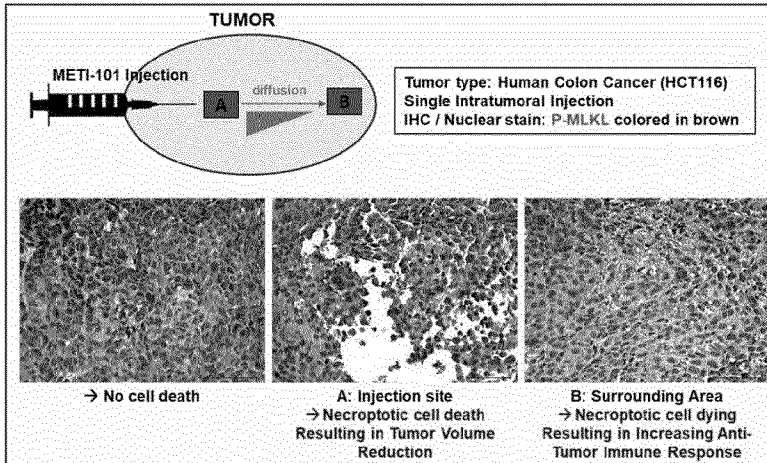
[도34]



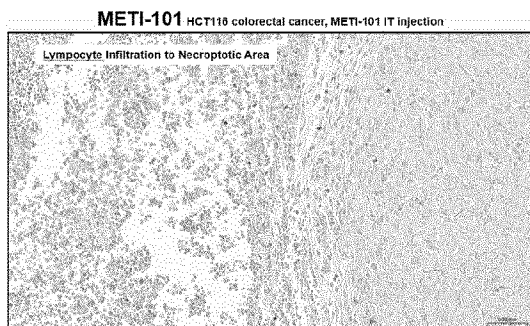
[도35]



[도36]

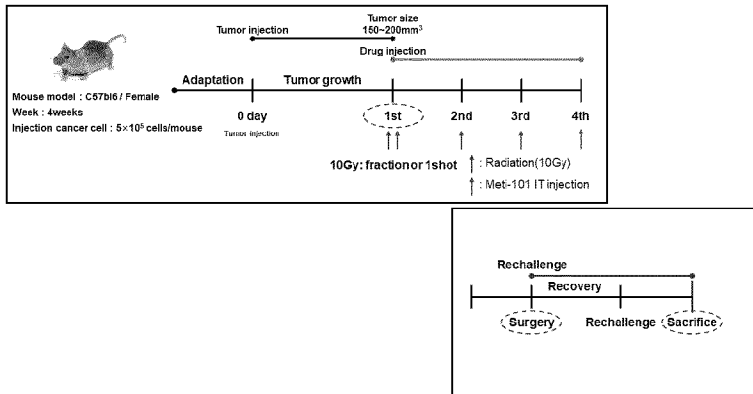


[도37]

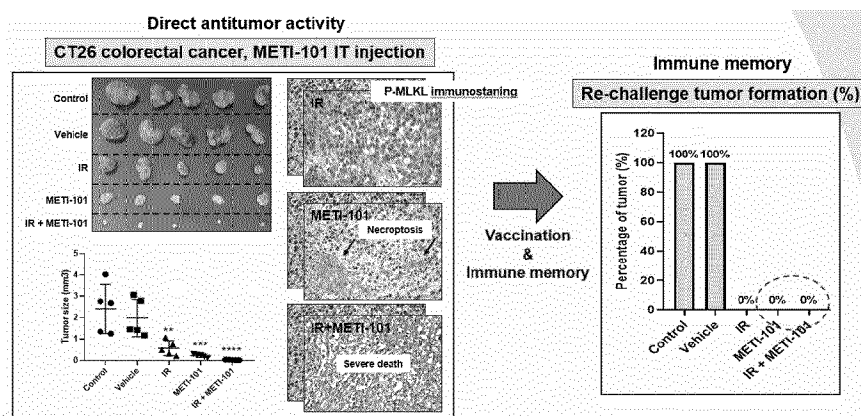


[도38]

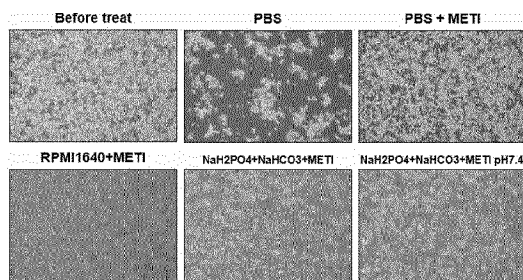
Scheme V2



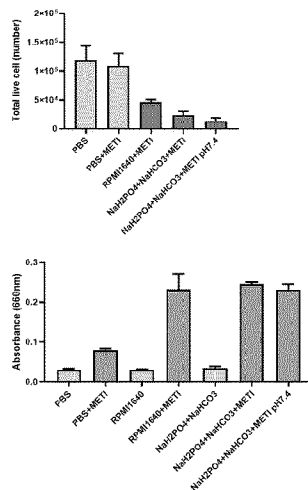
[도39]



[도40]



[도41]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/095840

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
A61K 33/06(2006.01)i; A61K 31/19(2006.01)i; A61K 33/42(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61K 39/39(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K 33/06(2006.01); A23L 33/10(2016.01); A61B 18/12(2006.01); A61B 18/14(2006.01); A61K 31/551(2006.01); A61K 39/395(2006.01); A61K 47/14(2006.01); A61K 47/36(2006.01); A61K 48/00(2006.01); C12N 15/10(2006.01)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 칼슘 락테이트(calcium lactate), 제1인산나트륨(monosodium phosphate), 사이토카인(cytokine), 종양특이항원(tumor specific antigen), 종양연관항원(tumor associated antigen), 탄산염(carbonate), 암(cancer)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	KR 10-2023-0004968 A (METIMEDI PHARMACEUTICALS CO., LTD.) 06 January 2023 (2023-01-06) See claim 1; and paragraphs [0020], [0021], [0047], [0101] and [0320].	1,4,5,8-10,13-15 2,3,6,7,11,12
A	KR 10-2016-0128284 A (GACHON UNIVERSITY OF INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 07 November 2016 (2016-11-07) See claims 1-18.	1-15
A	WO 2011-069587 A1 (CUREVAC GMBH et al.) 16 June 2011 (2011-06-16) See claims 1-18.	1-15
A	KR 10-2018-0113976 A (SENHWA BIOSCIENCES, INC.) 17 October 2018 (2018-10-17) See claims 1-42.	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 04 September 2024		Date of mailing of the international search report 04 September 2024
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/095840

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2021-181230 A1 (ARGA` MEDTECH SA) 16 September 2021 (2021-09-16) See claims 1-45.	1-15
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>		

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: **16-21**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 16-21 pertain to a method for treatment of the human body (PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv)).
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2024/095840

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2023-0004968	A	06 January 2023	CN	110087632	A	02 August 2019
				CN	110087632	B	19 September 2023
				CN	117180249	A	08 December 2023
				EP	3547999	A1	09 October 2019
				EP	3547999	A4	15 July 2020
				JP	2020-500870	A	16 January 2020
				KR	10-2018-0062063	A	08 June 2018
				KR	10-2019-0082949	A	10 July 2019
				KR	10-2512475	B1	22 March 2023
				US	11285121	B2	29 March 2022
				US	2019-0307712	A1	10 October 2019
				US	2022-0175706	A1	09 June 2022
				WO	2018-100442	A1	07 June 2018

KR	10-2016-0128284	A	07 November 2016	CN	107405320	A	28 November 2017
				CN	107405320	B	20 June 2023
				EP	3241551	A1	08 November 2017
				EP	3241551	A4	11 July 2018
				EP	3241551	B1	16 September 2020
				JP	2018-502913	A	01 February 2018
				JP	2021-020916	A	18 February 2021
				JP	7103789	B2	20 July 2022
				KR	10-1683635	B1	09 December 2016
				KR	10-1749308	B1	21 June 2017
				KR	10-1880542	B1	20 July 2018
				KR	10-2016-0082918	A	11 July 2016
				KR	10-2017-0029482	A	15 March 2017
				US	10525022	B2	07 January 2020
				US	11413261	B2	16 August 2022
				US	2017-0360727	A1	21 December 2017
US	2020-0113855	A1	16 April 2020				
WO	2016-108446	A1	07 July 2016				

WO	2011-069587	A1	16 June 2011	WO	2011-069528	A1	16 June 2011

KR	10-2018-0113976	A	17 October 2018	CN	108601789	A	28 September 2018
				EP	3377068	A1	26 September 2018
				EP	3377068	A4	19 June 2019
				JP	2018-534321	A	22 November 2018
				JP	2022-020003	A	27 January 2022
				JP	7017509	B2	08 February 2022
				US	10857156	B2	08 December 2020
				US	11191770	B2	07 December 2021
				US	11229654	B2	25 January 2022
				US	2017-0143737	A1	25 May 2017
				US	2019-0224209	A1	25 July 2019
				US	2021-0113584	A1	22 April 2021
				US	2022-0088029	A1	24 March 2022
				WO	2017-087235	A1	26 May 2017

WO	2021-181230	A1	16 September 2021	US	2023-0241100	A1	03 August 2023

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 33/06(2006.01)i; A61K 31/19(2006.01)i; A61K 33/42(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61K 39/39(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 33/06(2006.01); A23L 33/10(2016.01); A61B 18/12(2006.01); A61B 18/14(2006.01); A61K 31/551(2006.01); A61K 39/395(2006.01); A61K 47/14(2006.01); A61K 47/36(2006.01); A61K 48/00(2006.01); C12N 15/10(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 칼슘 락테이트(calcium lactate), 제1인산나트륨(monosodium phosphate), 사이토카인(cytokine), 종양특이항원(tumor specific antigen), 종양연관항원(tumor associated antigen), 탄산염(carbonate), 암(cancer)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X A	KR 10-2023-0004968 A ((주) 베타메디제약) 2023.01.06 청구항 1; 단락 [0020], [0021], [0047], [0101], [0320]	1,4,5,8-10,13-15 2,3,6,7,11,12
A	KR 10-2016-0128284 A (가천대학교 산학협력단) 2016.11.07 청구항 1-18	1-15
A	WO 2011-069587 A1 (CUREVAC GMBH 등) 2011.06.16 청구항 1-18	1-15
A	KR 10-2018-0113976 A (센화 바이오사이언시즈 인코포레이티드) 2018.10.17 청구항 1-42	1-15
A	WO 2021-181230 A1 (ARGA` MEDTECH SA) 2021.09.16 청구항 1-45	1-15
<input type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일	
2024년09월04일(04.09.2024)	2024년09월04일(04.09.2024)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소	심사관	
대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)	허주형	
팩스 번호 +82-42-481-8578	전화번호 +82-42-481-5373	

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

- 1. 청구항: **16-21**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 16-21은 인체의 치료방법에 해당합니다 (PCT 17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)).

- 2. 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,

- 3. 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2023-0004968 A	2023/01/06	CN 110087632 A	2019/08/02
		CN 110087632 B	2023/09/19
		CN 117180249 A	2023/12/08
		EP 3547999 A1	2019/10/09
		EP 3547999 A4	2020/07/15
		JP 2020-500870 A	2020/01/16
		KR 10-2018-0062063 A	2018/06/08
		KR 10-2019-0082949 A	2019/07/10
		KR 10-2512475 B1	2023/03/22
		US 11285121 B2	2022/03/29
		US 2019-0307712 A1	2019/10/10
		US 2022-0175706 A1	2022/06/09
		WO 2018-100442 A1	2018/06/07
		KR 10-2016-0128284 A	2016/11/07
CN 107405320 B	2023/06/20		
EP 3241551 A1	2017/11/08		
EP 3241551 A4	2018/07/11		
EP 3241551 B1	2020/09/16		
JP 2018-502913 A	2018/02/01		
JP 2021-020916 A	2021/02/18		
JP 7103789 B2	2022/07/20		
KR 10-1683635 B1	2016/12/09		
KR 10-1749308 B1	2017/06/21		
KR 10-1880542 B1	2018/07/20		
KR 10-2016-0082918 A	2016/07/11		
KR 10-2017-0029482 A	2017/03/15		
US 10525022 B2	2020/01/07		
US 11413261 B2	2022/08/16		
US 2017-0360727 A1	2017/12/21		
US 2020-0113855 A1	2020/04/16		
WO 2016-108446 A1	2016/07/07		
WO 2011-069587 A1	2011/06/16	WO 2011-069528 A1	2011/06/16
KR 10-2018-0113976 A	2018/10/17	CN 108601789 A	2018/09/28
		EP 3377068 A1	2018/09/26
		EP 3377068 A4	2019/06/19
		JP 2018-534321 A	2018/11/22
		JP 2022-020003 A	2022/01/27
		JP 7017509 B2	2022/02/08
		US 10857156 B2	2020/12/08
		US 11191770 B2	2021/12/07
		US 11229654 B2	2022/01/25
		US 2017-0143737 A1	2017/05/25
		US 2019-0224209 A1	2019/07/25
		US 2021-0113584 A1	2021/04/22
		US 2022-0088029 A1	2022/03/24
		WO 2017-087235 A1	2017/05/26
WO 2021-181230 A1	2021/09/16	US 2023-0241100 A1	2023/08/03