(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0096304
(43) 공개일자 2012년08월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/19 (2006.01) *A61K 31/185* (2006.01)
A61K 31/353 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0015639
(22) 출원일자 2011년02월22일
심사청구일자 2011년02월22일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스내 (서천동, 경희대학교)
(72) 발명자
배현수
서울특별시 서초구 반포대로 316, 한신시티 21 오피스텔 218호 (잠원동)
이희경
서울특별시 노원구 섬밭로 196, 614동 1104호 (하계동, 장미아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
손민

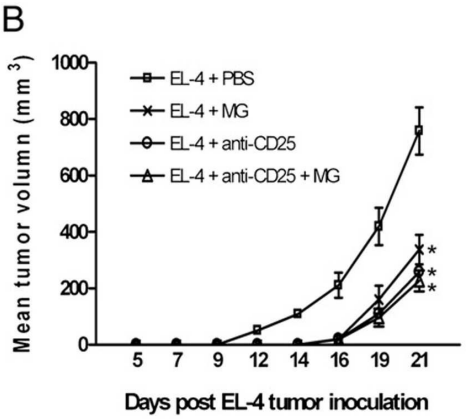
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **메틸 갈레이트를 포함하는 조절 T 세포 활성 억제용 약학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 메틸 갈레이트 또는 약제학적으로 허용가능한 그의 염을 포함하는 비정상적 조절 T 세포 활성 관련 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물, 항암제 저항성 저해용 항암 보조제 및 항암 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 메틸 갈레이트 화합물은 조절 T 세포의 비정상적 활성을 억제함으로써 비정상적 조절 T 세포 활성으로 인하여 발생하는 질환을 치료할 수 있고, 특히 면역-기반 암 치료에서 조절 T 세포를 통한 종양-특이적 면역 반응 억제를 저해함으로써 암 치료 효과를 향상시킬 수 있으므로 항암제 저항성 저해 용도로 사용할 수 있다.

대 표 도 - 도3b



(72) 발명자

이효정

인천광역시 서구 마전동 검단 2차 아이파크아파트 204동 1202호

권영주

서울특별시 송파구 올림픽로 135, 250동 1003호 (잠실동, 리센츠)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

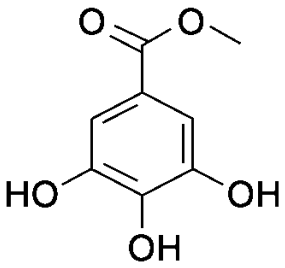
과제고유번호	2009-0063466
부처명	교육과학기술부
연구사업명	기초과학연구사업
연구과제명	면역조절 및 항암제 부작용 억제 효능 한방소재 개발
주관기관	경희대학교 산학협력단
연구기간	2007.05.01 ~ 2016.02.29

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 메틸 갈레이트 또는 약제학적으로 허용되는 그의 염을 포함하는 비정상적 조절 T 세포 활성 관련 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서, 상기 메틸 갈레이트는 목단피로부터 분리된 것인 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 비정상적 조절 T 세포 활성 관련 질환은 비정상적 면역 억제로 인한 질환인 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 비정상적 조절 T 세포 활성 관련 질환은 B형 바이러스성 간염, C형 바이러스성 간염, 헬리코박터 파일로린 감염성 질환 또는 암인 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조성물은 조절 T 세포 이동을 저해하는 것인 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 조성물은 조절 T 세포의 주요 전사 인자인 Foxp3(forkhead box P3) 발현을 감소시키는 것인 조성물.

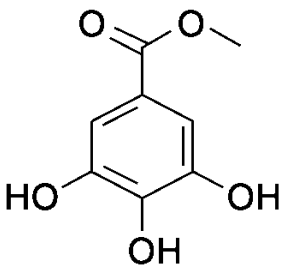
청구항 7

제1항에 있어서, 상기 조성물은 조절 T 세포의 이펙터 T 세포에 대한 억제 활성을 저해하는 것인 조성물.

청구항 8

하기 화학식 1로 표시되는 메틸 갈레이트 또는 약제학적으로 허용되는 그의 염을 포함하는 항암제 저항성 저해용 항암 보조제.

[화학식 1]



청구항 9

제8항에 있어서, 상기 항암제는 암 치료 백신 (therapeutic cancer vaccine)인 항암 보조제.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 암은 유방암, 폐암, 대장암, 피부암, 신장암 및 전립선암 중 선택되는 1 이상인 항암 보조제.

청구항 11

제8항 내지 제10항 중 어느 한 항에 기재된 항암 보조제 및 항암제를 포함하는 항암 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 메틸 갈레이트를 포함하는 비정상적 조절 T 세포 활성 관련 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물, 항암제 저항성 저해용 항암 보조제 및 항암 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] T 세포는 흉선에서 교육을 받아 크게 네 가지 종류의 T 세포로 나뉘는데, 이펙터 T 세포(effector T cell), 도움 T 세포(helper T cell), 조절 T 세포(regulatory T cell), 기억 T 세포(memory T cell)가 그것이다. 이들은 세포 표면에 있는 단백질 분자에 의해 구분이 되는데, 이펙터 T 세포의 경우 CD8이, 도움 T 세포의 경우 CD4가, 조절 T 세포의 경우 CD4와 CD25가 발현되어 있어 구별이 가능하다. 항원에 대하여, 도움 T 세포가 사이토카인(cytokine)과 같은 특정 물질을 분비하여 이펙터 T 세포와 B 세포의 활성을 증대시키고 이펙터 T 세포는 항원을 표포함하는 세포들을 죽이게 되며, B 세포는 항체를 분비하여 항원의 활성을 저해한다. 이때, 조절 T 세포는 면역활동을 적절히 조절하는 것으로 알려져 있다.

[0003] 조절 T 세포 (이하, CD4+CD25+ Treg 세포 또는 Treg 세포라고도 칭함)는 흉선에서 분화되고 흉선으로부터 말초로 이동된다고 알려져 있다. 사카구치(Sakaguchi)에 의하여 조절 T 세포가 자기 항원에 대한 면역 관용(self-tolerance)의 주요 조절 인자라는 것이 확인된 이후, 조절 T 세포는 자기항원에 대한 면역 관용을 유지하는 작용뿐만 아니라, 자기 항원, 병원체, 종양 항원 및 이식된 항원 등에 대한 면역 반응을 비롯한 전체 면역 반응 시스템에서 조절 작용을 하는 것으로 확인되고 있다. 조절 T 세포는 여러 가지 억제 방식을 통하여 후천적 및 선천적 면역을 조절할 수 있다. 조절 T 세포 구획화 및 수송은 조직 및/또는 기관 특이적일 수 있고, 조절을 필요로 하는 부위에서의 조절 T 세포의 선택적 정체 및 수송을 위하여 상이한 케모카인 수용체 및 인테그린 발현을 통할 수 있다.

[0004] 한편, 종양은 종양 연관 항원(tumor-associated Ag, TAA)을 발현하고, 그것은 면역 공격의 대상이 된다. 암-보유 숙주는 보유하고 있는 종양 세포에 대한 특이적 면역 반응을 나타낸다. 따라서, 다양한 암 치료 백신 전략을 이용하여 숙주의 항종양 면역을 촉진함으로써 암 치료를 개선하려는 연구가 진행되고 있다. 그러나, 최근의 증거에 의하면, 암-보유 숙주는 조절 T 세포를 통하여 자기 TAA에 대한 면역 관용을 발생시킴으로써 TAA-특이적 면역 반응을 극복하는 것으로 확인되었다. 구체적으로, 모든 난소암 단계 동안 종양과 관계없는 림프 기관에서보다 종양이 배출되는 림프절에 더 적은 조절 T 세포가 존재하였는데, 이는 조절 T 세포가 림프절로부터 종양으로 이동할 수 있음을 암시한다. 또한, 항종양 이펙터 세포의 활성화에 대한 조절 T 세포의 억제 효과 또한 다양한 마우스 종양 모델에서 설명되어 왔다.

[0005] 위와 같이, 조절 T 세포는 종양-특이적 면역 반응을 억제하고, 종양 성장을 촉진하며, 그 결과 환자 생존율이 낮아지게 되므로, 면역-기반 암 치료를 위하여, 조절 T 세포의 종양-특이적 면역 반응을 억제 작용을 이해하는 것이 중요하다. 면역-기반 암 치료뿐만 아니라, 전체 면역 반응 시스템의 비정상적 조절로 인하여 발생하는 질환을 치료하기 위하여, 조절 T 세포의 면역 반응 억제 작용을 이해하고, 이를 조절할 수 있는 물질을 개발할 필요가 있다.

[0006] 한편, 식물에서 발견된 많은 화학물질들이 세포 주기를 정지시키고 암세포에서 아폽토시스를 유도하는 것을 포함하는 항산화 활성 및 항암 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 최근, 몇몇 갈레이트-유래 화합물이 *Casearia sylvestris* 잎의 알코올 추출물로부터 분리되었고, 여러 가지 유형의 종양 유래 세포의 성장을 저해할 수 있다고 확인된 바 있다. 그러나, 종양 세포의 직접적인 아폽토시스를 유도하지 않으면서 암치료의 효과를 향상시킬 수 있는 메틸 갈레이트 화합물에 대해 알려진 바는 없다.

발명의 내용

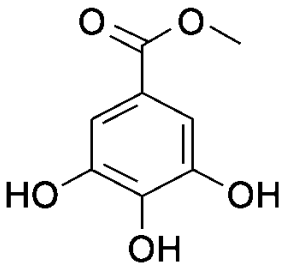
해결하려는 과제

[0007] 본 발명자는 식물에서 분리된 메틸 갈레이트 화합물이 조절 T 세포의 비정상적 활성을 억제함으로써 비정상적 조절 T 세포 활성으로 인하여 발생하는 질환을 치료할 수 있고, 특히 면역-기반 암 치료에서 조절 T 세포를 통한 종양-특이적 면역 반응 억제를 저해함으로써 암 치료 효과를 향상시킬 수 있음을 발견하여 예의 연구한 결과 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0008] 하나의 양태로서, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 메틸 갈레이트 또는 약제학적으로 허용되는 그의 염을 포함하는 비정상적 조절 T 세포 활성 관련 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물을 제공한다.

화학식 1

[0009] 

[0010] 상기 메틸 갈레이트는 천연물질, 바람직하게는 목단피로부터 분리하거나, 당업계의 공지된 방법으로 화학적 합성법에 의해 제조하거나, 시판되는 물질을 사용할 수 있다. 또한, 상기 메틸 갈레이트는 용매화물 또는 전구약물(pro-drug) 형태일 수 있으며, 용매화물은 바람직하게는 수화물 및 에탄올화물을 포함한다.

[0011] 상기 "약제학적으로 허용가능한 그의 염"은 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들어 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 수혼화성 유기 용매, 예를 들어 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조한다. 동몰량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알콜(예, 글리콜 모노메틸 에테르)을 가열하고, 이어서 상기 혼합물을 증발시켜 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시킬 수 있다. 이때, 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 인산, 황산, 질산, 주석산 등을 사용할 수 있고 유기산으로는 메탄술폰산, p-톨루엔술폰산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 말레인산(maleic acid), 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산(fumaric acid), 만데르산, 프로피온산 (propionic acid), 구연산(citric acid), 젖산(lactic acid), 글리콜산(glycollic acid), 글루콘산(gluconic acid), 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산(glutaric acid), 글루쿠론산(glucuronic acid), 아스파르트산, 아스코르브산, 카본산, 바닐릭산, 히드로아이오딕산 등을 사용할 수 있으며, 이들에 제한되지 않는다.

[0012] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속염은, 예를 들어 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해시키고, 비용해 화합물 염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로서는 특히 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하나 이들에 제한되는 것은 아니다. 또한, 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은염(예: 질산은)과 반응시켜 얻을 수 있다.

[0013] 본 발명에서 "비정상적 조절 T 세포 활성 관련 질환"은 조절 T 세포의 비정상적 활성으로 인해 야기되는 질환을 의미하며, 구체적으로, 면역 반응을 억제하는 조절 T 세포의 활성이 비정상적으로 작용함으로 인해 야기되는 질환을 의미한다. 이러한 질환으로는 B형 바이러스성 간염, C형 바이러스성 간염, 헬리코박터 파일로린 감염 등과 같은 다양한 감염성 질환 또는 암 등을 예로 들 수 있다.

[0014] 본 발명의 "예방 또는 치료"에서 '예방'이란 메틸 갈레이트 또는 약제학적으로 허용가능한 그의 염을 포함하는 약학적 조성물을 투여함으로써 비정상적 조절 T 세포의 활성 증가에 따르는 모든 질환의 발병을 억제시키거나 발병을 지연하는 모든 행위를 말하며, '치료'란 상기 약학적 조성물의 투여로 비정상적 조절 T 세포의 활성 증가로 인한 모든 질병을 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

[0015] 본 발명의 구체예에서, 메틸 갈레이트는 조절 T 세포 이동을 저해하였고, CD4+CD25+ Treg 세포에서 주요 전사 인자인 Foxp3(forkhead box P3) 발현을 감소시켰으며, CD4+CD25+ Treg 세포의 CD4+ CD25- T 세포에 대한 억제 활성을 저해하였다.

[0016] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 메틸 갈레이트 또는 약제학적으로 허용되는 그의 염을 포함하는 항암제 저항성 저해용 항암 보조제를 제공한다.

[0017] 현재까지 많은 항암제의 개발에도 불구하고, 항암제만으로 완치가 가능한 암은 소수암에 불과한데, 그 이유는 항암제를 이용한 암 치료시 항암제에 암 세포가 반응을 하지 않거나 초기에는 효과적으로 종양이 줄어들지만 치료 도중 또는 치료 후에 항암제에 대한 내성이 생기기 때문이다. 따라서 효과적인 항암제 치료를 위해서는 상기한 바와 같은 항암제에 대한 암세포의 내성 등 항암제에 대한 저항성을 극복하여야 한다.

[0018] 본 발명에서 항암제 저항성이란, 항암제 투여시 투여한 약물이 항암세포를 사멸시키지 못하거나 사멸시키는 정도가 미비한 것을 말하는 것으로서 항암제 내성이 가장 빈번한 원인이다. 일반적으로 "항암제에 대한 내성"이란, 항암제를 이용하여 암 환자를 치료할 때, 치료 초기부터 치료 효과가 없거나 초기에는 암 치료 효과가 있으나 계속적인 치료 과정에서 암 치료 효과가 상실되는 것을 의미한다.

[0019] 바람직하게는, 상기 항암제는 암 치료 백신 (therapeutic cancer vaccine)일 수 있다. 암 치료 백신이란, 암세포가 발현하는 종양 연관 항원(tumor-associated Ag, TAA)을 표적으로 하여, 상기 항원의 에피토프 일부 또는 전부를, 단독으로 또는 어쥬번트와 함께, 또는 생체 외에서 배양된 항원 표출 세포(antigen-presenting cells, APCs)에 의하여 표출된 형태로 투여하여 면역화함으로써 숙주의 종양-특이적 면역 반응을 촉진하여 암을 치료하고자 하는 항암제 종류를 의미한다.

[0020] 암-보유 숙주는 조절 T 세포를 통하여 자기항원에 대한 면역 관용을 발생시키는데, 조절 T 세포가 암세포에 의하여 종양 세포로 이동, 축적됨으로써, 자기항원의 일종인 종양 연관 항원(TAA)에 대한 면역 관용이 발생된다. 그 결과, 암-보유 숙주에서의 종양-특이적 면역 반응이 억제되어 암세포는 암 치료 백신 등의 면역-기반 항암제에 대하여 저항성을 가지게 되고, 암 치료 효과가 현저히 낮아지게 된다.

[0021] 본 발명의 구체예에서, 본 발명의 메틸 갈레이트 또는 약제학적으로 허용가능한 그의 염은 상기 조절 T 세포의 비정상적 활성을 억제함으로써 종양-특이적 면역 반응의 억제를 감소시키고, 결국 암 치료 효과를 높였다. 구체적으로, 메틸 갈레이트는 비장의 CD4+CD25+ Foxp3+ Treg 세포, 및 CD4+CD25+ Treg 세포의 종양 침윤을 억제하고, EL-4 림프종 모델에서 종양 성장을 감소시켜 숙주의 장기 생존율을 개선시켰다. 한편, 메틸 갈레이트는 항-CD25 Ab를 처리한 군에서는 종양 성장 감소 효과를 나타내지 않았다. 이는 메틸 갈레이트에 의한 종양 성장 감소 효과는 CD4+CD25+ Treg 세포의 조절에 의하여 매개되는 것임을 나타낸다. 상기 암은 유방암, 폐암, 대장암, 피부암(흑색종), 신장암, 전립선암 등을 포함하며 이에 제한되지 않는다.

[0022] 한편, 본 발명의 메틸 갈레이트는 기존의 항암제가 암세포의 세포 주기를 직접적으로 정지시키거나 암세포에서 아폽토시스를 직접적으로 유도하는 것과 달리, 종양 세포의 세포 주기에 영향을 미치지 않는다. 따라서, 본 발명의 메틸 갈레이트는 정상세포에도 세포 독성 효과를 갖는 기존의 항암제의 부작용을 극복할 수 있고, 항암제 저항성을 저해하기 위한 항암 보조제 용도로 사용되어 암 치료 효과를 향상시킬 수 있다.

[0023] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 항암 보조제 및 항암제를 포함하는 항암 조성물을 제공한다. 항암제란 암세포를 죽이기 위해 사용되는 모든 약제를 총칭하며, 대부분의 약제는 암 세포의 DNA의 복제, 전자, 번역 과정을 차단하게 된다. 본 발명의 조성물에 사용될 수 있는 항암제의 종류는 특별히 한정되지 않는다. 항암제는 암세포의 종류, 항암제의 흡수 속도(치료기간과 항암제 투여 경로), 종양의 위치, 종양의 크기 등의 항암제 선택시 고려하는 일반적인 원칙 하에 선택될 수 있다. 바람직하게는 상기 항암제는 암 치료 백신(therapeutic cancer vaccine)을 비롯한 면역-기반 항암제일 수 있다.

[0024] 본 발명의 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있으며, 본 발명에서 용어, "약학적으로 허용가능한 담체"란 생물체를 상당히 자극하지 않고 투여 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 말한다. 상기의 조성물은 담체와 함께 제제화 될 수 있다. 경구투여용 제형의 경우, 예를 들면 트로키제(troches), 로젠지(lozenge), 수성 또는 유성 현탁액, 조제분말 또는 과립, 에멀젼, 하드 또는 소프트 캡슐, 시럽 또는 엘릭시르(elixirs)로 제제화될 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 정제 및 캡슐 등의 제형으로 제조하기 위하여, 락토오스, 사카로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아밀로펙틴, 셀룰로오스 또는 젤라틴과 같은 결합제와 디칼슘 포스페이트와 같은 부형제, 옥수수 전분 또는 고구마 전분과 같은 붕괴제 및 스테아르산 마그네슘, 스테아르산 칼슘, 스테아릴푸마르산 나트륨 또는 폴리에틸렌글리콜 왁스와 같은 윤활유가 함유될 수 있다. 캡슐제형의 경우는 상기에서 언급한 물질 이외에도 지방유와 같은 액체 담체를 포함할 수 있다.

[0025] 비경구 투여용 제형으로 제제화하기 위해서는, 클로로겐산을 피하주사, 정맥주사 또는 근육내 주사 등의 주사용 형태, 좌제 주입방식 또는 호흡기를 통하여 흡입이 가능하도록 하는 에어로졸제등 스프레이용으로 제제화할 수 있다. 주사용 제형으로 제제화하기 위해서는 클로로겐산을 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고, 이를 앰플 또는 바이알의 단위 투여용으로 제제한다. 좌제로 주입하기 위해서는, 코코아버터 또는 다른 글리세라이드 등 통상의 좌약 기제를 포함하는 좌약 또는 체료 관장제와 같은 직장투여용 조성물로 제제화 할 수 있다. 에어로졸제 등 스프레이용으로 제형화하는 경우, 수분산된 농축물 또는 습윤 분말이 분산되도록 추진제 등이 첨가제와 함께 배합될 수 있다.

[0026] 또 다른 양태로서, 본 발명은 메틸 갈레이트 또는 약제학적으로 허용되는 그의 염을 포함하는 항암제 저항성 저해용 항암 보조제를 투여하여 항암제 저항성을 극복하는 방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 메틸 갈레이트 또는 약제학적으로 허용되는 그의 염을 포함하는 약학적 조성물을 투여하여 비정상적 조절 T 세포 활성 관련 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0027] 본 발명에서 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 경구 투여, 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여, 강내 투여, 복강내 투여 또는 경막내 투여 될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명에 따른 조성물은 항암제와 함께 또는 항암제를 투여하기 전 또는 투여하고 난 후에 일정 시차를 두고 항암제와 별도로 투여될 수 있으나, 바람직하게는 항암제를 투여한 후 투여한다. 본 발명의 조성물은 일회 투여될 수도 있고, 또는 일정한 시간 간격을 두고 2회 또는 3회 투여될 수도 있다.

발명의 효과

[0028] 본 발명의 메틸 갈레이트 화합물은 조절 T 세포의 비정상적 활성을 억제함으로써 비정상적 조절 T 세포 활성으로 인하여 발생하는 질환을 치료할 수 있고, 특히 면역-기반 암 치료에서 조절 T 세포를 통한 종양-특이적 면역 반응 억제를 저해함으로써 암 치료 효과를 향상시킬 수 있으므로 항암제 저항성 저해 용도로 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 메틸 갈레이트 처리 후 CD4+CD25+ Treg 세포의 기능 분석 결과를 나타낸 것이다. A, 96-well 케모택시스 챔버 어세이를 이용하여 Treg 세포의 이동을 평가하였다. 분리된 CD4+CD25+ Treg 세포를 48시간 동안 지정된 농도(0-50 μg/ml)의 메틸 갈레이트로 처리하였다. EL-4 림프종의 배양 상등액을 이동 어세이에 사용하였

다 (대조군; 정상세포의 상등액). B, 항-CD3 Ab 및 항-CD28 Ab의 존재 하에서 3일 동안 메틸 갈레이트로 CD4+CD25+ Treg 세포를 처리하였다. CD69, CTLA-4, GITR, CCR4, CCR5, CXCR3, 및 CXCR4를 포함하는 표면 마커를 FACSCalibur CellQuest software를 이용하여 분석하였다. 회색 영역은 이소타입 대조군 염색; 흰색 영역은 특이적 염색을 나타낸다. 데이터는 유사 결과를 나타낸 3회의 분리된 실험의 대표값이다. 또한, CD4+CD25+ Treg 세포는 $Foxp3^{EGFP}$ 마우스로부터 분리하였다. C, CD4+CD25+ Treg 세포에 대한 메틸 갈레이트의 세포독성 능력을 확인하기 위하여, Cell Titer 96 비방사능 세포 증식 어세이를 사용하였다. 세포 생존능력에 대한 수치는 대조군에 대한 수치에 대하여 정규화하였다. D, FACSCalibur CellQuest software를 이용하여 Foxp3-양성 세포의 퍼센트를 분석하였다. E, Foxp3의 mRNA 발현 수준을 정량하기 위하여 실시간 PCR을 수행하였다. 발현율은 대조군으로서 GAPDH mRNA 발현 정도를 이용하여 정규화하였다. F, MACS-정제된 CD4+CD25- Treg 세포를 CFSE-표지된 반응 세포로서 사용하였다. 7일동안 10 μg/ml 메틸 갈레이트와 함께 또는 메틸 갈레이트 없이, 항-CD3/CD28 비드 및 100 ng/ml IL-2 존재 하에서 배양된 자기 유래의 MACS-분리된 CD4+CD25+ Treg 세포를 상기 반응 세포에 2:1의 비율로 첨가하였다. 게이트를 CD25+ 및 CFSE 세포 상에 설정하고, FACSCalibur CellQuest software를 이용하여 분석하였다. 반응 세포 증식의 억제는 퍼센트로 표시되었다. 3회의 분리된 실험의 대표값이다. 데이터는 평균 ± SEM로 표시하였다. one-way ANOVA 에 의하여 결정된 양성 대조군 대비 *p < 0.05; **p < 0.01

도 2는 메틸 갈레이트 처리한 EL-4 세포의 세포 주기 분석 결과를 나타낸 것이다. 세포를 다양한 농도의 메틸 갈레이트 및 그 후 프로피디움 요오드화물과 배양하였다. A, DNA 함량을 유세포 분석을 이용하여 측정하고, ModiFit LT Software (VER 3.0, Verity Software House, Topsham, ME)를 이용하여 분석하였다. B, A로부터 각 세포 주기 단계의 퍼센트를 보여주는 그래프이다. G1, S, 및 G2는 세포 주기 단계를 나타낸다.

도 3은 메틸 갈레이트에 의한 종양 성장 저해 및 생존 연장을 나타낸 것이다. A, C57BL/6 마우스를 우측 옆구리에 1×10^4 EL-4 림프종 세포로 피하주사하고 처리 전에 임의 추출하였다. 항-CD25 Abs를 23, 22, 및 21일에 복강 내 투여하고, 메틸 갈레이트를 종양 주사 후 5일부터 주당 3회 주입하였다. 21일째 수집된 종양의 사진이다. 원래 배율 X 1. B, 종양 부피 및 2개의 수직 지름을 대략 주당 3회 측정하였다. 데이터는 평균 ± SEM로 표시하였다. one-way ANOVA 에 의하여 결정된 PBS-처리군 대비 *p < 0.05 (n = 15). C, 생존정도는 종양 주사 후 표시된 날에 생존한 마우스의 퍼센트로 표시되었다. *p < 0.05 EL-4 군 대비, n = 20; **p < 0.01 EL-4 군 대비, n = 20. nu/nu 마우스에서의 종양 진행 (D) 및 생존 (E)을 측정하였다(n = 10).

도 4는 메틸 갈레이트에 의한 비장 CD4+CD25+ Foxp3+ Treg 세포 및 종양-침윤 CD25+Foxp3+ 세포의 유세포 분석 결과를 나타낸 것이다. A, 분리된 스플레노사이트를 항-CD4 PE 및 항-CD25 알로피코시아닌으로 염색하고 유세포 분석하였다. CD4+CD25+ 세포는 $Foxp3^{EGFP}$-양성 세포 상에 게이트 되고 분석되었다. 대표 유세포 분석 수치를 5개 표본으로부터 선택하였다. CD4+CD25+ (대조군, 3.35 ± 0.14%; 메틸 갈레이트, 3.07 ± 0.15%) 및 CD4+CD25+ Foxp3+ (대조군, 1.30 ± 0.07%; 메틸 갈레이트, 0.80 ± 0 0.1%) 세포의 평균 유세포 분석 데이터를 평균 ± SE(n = 5)로 나타내었다. B, 단일-세포 현탁액을 항-CD25 알로피코시아닌으로 염색한 종양으로부터 준비하고 유세포분석을 이용하여 $Foxp3^{EGFP}$-양성 세포에 대하여 분석하였다. 5가지 상이한 종양에 대하여 CD25+ Foxp3+ 세포의 하나의 대표값 및 평균 퍼센트 ± SD (대조군, 0.35 ± 0.05%; 메틸 갈레이트, 0.20 ± 0.02%)를 나타내었다.

도 5는 종양-침윤 $Foxp3^{EGFP}$ 세포를 평가한 것이다. A, $Foxp3^{EGFP}$-양성 세포를 20-mm-두께 박편으로 자르고 Zeiss LSM5 공초점 현미경으로 분석하였다(원래 배율 X 200). B, $Foxp3^{EGFP}$ 세포의 개수를 림프종 박편 당 3 영역에서 계수하였다. 데이터는 평균 ± SEM로 표시하였다. 통계는 스튜던트 t 테스트를 이용하여 수행하였다. ***p < 0.001.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0031] <실험 방법>

[0032] **세포, 시약, 항체, 및 동물**

[0033] EL-4 마우스 림프종 세포주는 Korean Cell Line Bank (KCLB 40039; Cancer Research Institute, Seoul, Korea)로부터 획득하였다. 상기 세포는 10% FBS (HyClone, Logan, UT) 및 페니실린-스트렙토마이신 (Invitrogen)으로 보충된 DMEM (Invitrogen, Rockville, MD) 배지에서 조직 배양 플레이트(Corning Glass, Corning, NY)에서 배양되었다.

[0034] 메틸 갈레이트는 ChromaDex (Irvine, CA) 로부터 구입하였고 증류수에 용해시켰다. PE-표지된 항-마우스 CD69 mAb (H1.2F3; hamster IgG), PE-CTLA4 mAb (UC10-4B9; hamster IgG), PE- CXCR3 mAb (CXCR3-173; hamster IgG), PE-CCR5 mAb (HM-CCR5; hamster IgG), PE-CXCR4 mAb (2B11; rat IgG2b), PE-글루코코르티코이드-유도된 TNFR (GITR) mAb (DTA-1; rat IgG2b), PE-CD8 mAb, 및 이소타입-매치되는 mAb는 eBioscience (San Diego, CA)로부터 구입하였다. 또한, PE-CCR4 mAb (2G12-CCR4; hamster IgG) 는 Biolegend (San Diego, CA)로부터 획득하였다

[0035] C57BL/6 마우스 (6-8 주령, 체중 20-25 g) 및 nu/nu 수컷 마우스 (C.Cg-Foxnl-nu/CrljBg) 는 Charles River Korea (Seungnam, Seoul, South Korea)로부터 구입하였다. Foxp3^{EGFP}C57BL/6 (C.Cg-Foxp3^{tm2Tch}/J) 마우스는 The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME)로부터 구입하였다. 모든 마우스는 무균 조건에서 기온 조절 및 12 시간 명/암 주기 하에서 보관되었다. 또한, 모든 마우스는 실험 동안 음식 및 물이 제한없이 제공되었다. 본 실험은 Kyung Hee University Institutional Animal Care and Use Committee [KHUASP(SE)- 09-017]에 의하여 승인되었다.

[0036] **세포 주기 분석**

[0037] 세포는 24시간 내에 60-70% 컨플루언시에 도달하기 위하여 지정된 농도에서 6-웰 배양 접시에 플레이트 되었다. 그 후 세포를 다양한 농도(0-50 μg/ml)의 메틸 갈레이트로 처리하였다. 24시간 후, 세포를 PBS로 2회 세척하고 펠렛을 4℃에서 1시간동안 70% 에탄올로 고정시켰다. 그 후, 세포를 PBS로 세척하고, RNase 포함 프로피디움 요오드화물 용액(0.05 mg/ml)으로 재현탁한 후 30 분동안 암실에서 상온에서 배양하였다. DNA 함량을 유세포 분석기를 이용하여 분석하였다.

[0038] **CD4+CD25+ Treg 및 CD4+CD25- T 세포 분리**

[0039] CD4+CD25+ Treg 및 CD4+CD25- T 세포를 마그네틱 비드 분리 (CD4+CD25+ Treg 세포 키트; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)을 이용하여 수컷 C57BL/6 또는 Foxp3^{EGFP}C57BL/6 마우스로부터 획득한 비장으로부터 분리하였다. 잠시, 비-CD4+ T 세포를 비오틴화 Ab 혼합물 및 항-비오틴 마이크로비드를 이용하여 감소시켰다. CD4+CD25- T 세포는 PE-표지된 항-CD25 mAb 및 항-PE 마이크로비드를 이용하여 CD4+CD25+ Treg 세포로부터 선택되었다. 두 집단의 순도는 유세포 분석에 의하여 결정되었고 통상적으로 >93%에 달했다.

[0040] **트랜스웰(Transwell) 이동 어세이**

[0041] 분리된 CD4+CD25+ Treg 세포를 48시간 동안 지정된 농도의 메틸 갈레이트로 처리하였다. EL-4 림프종의 배양 상등액을 이동 어세이에 사용하였고, 이동 어세이는 QCM 케모택시스 96-웰 (5 μM) 세포 이동 키트 (Millipore, Billerica, MA)를 이용하여 제조자의 지시에 따라 수행되었다.

[0042] **시험관 내 세포독성 어세이**

[0043] CD4+CD25+ Treg 세포에 대한 메틸 갈레이트의 세포독성 능력을 확인하기 위하여, Cell Titer 96 비방사능 세포 증식 어세이를 제조자(Promega, Madison, WI)의 지시에 따라 사용하였다. 세포를 100μl의 총 부피 내에 2 x 10^4/웰로 플레이트하였다. 그 후 세포를 2회 세척하고 메틸 갈레이트(0, 0.01, 0.1, 1, 10, 및 50 μg/ml) 포함 배지에서 배양하였다. 세포를 5% CO_2 배양기에서 37℃ 에서 48시간 동안 배양하였다. 세포 생존능력에

대한 수치는 대조군에 대한 수치에 대하여 정규화하였다.

[0044] **시험관 내 증식 어세이**

[0045] T 세포 면역억제를 공동배양 시스템에서 시험하였다. CD4+CD25- T 세포 (2×10^5/ml) 를 2.5 μg/ml 항-CD3 Ab (clone 145-2C11; BD Biosciences, San Jose, CA) 및 1.2 μg/ml 항-CD28 Ab (clone 37.51; BD Biosciences)로 자극하고, 그 후 공동배양하기 전에 CFSE (Molecular Probes, Eugene, OR)로 표지하였다. CD4+CD25+ T 세포를 항-CD3 및 항-CD28 Abs 및 rIL-2 (100 ng/ml; BD Bioscience)의 존재 하에 3일동안 메틸 갈레이트로 처리하였다. 두 집단을 7일 동안 공동배양하고, 그 후 세포를 항-CD25 PE Ab에 대하여 염색하였다. CD4+CD25- T 세포의 증식을 유세포 분석기를 이용하여 측정하고, CFSE 형광 강도에 의하여 정의되는 1회 이상 분열을 거친 세포의 퍼센트로 보고하였다.

[0046] **실시간 PCR 분석**

[0047] 총 세포 RNA를 제조자의 프로토콜에 따라 TRIzol 시약 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)를 이용하여 추출하고, 그 후 총 RNA의 농도를 260 nm 에서의 OD (OD 260)를 측정함으로써 정량화하였다. 그 후 반응 혼합물에 대하여 15초동안 95℃ 에서의 변성 및 1분동안 60℃에서의 어닐링의 40 사이클을 수행하였다. 증폭은 하기 유전자-특이적 프라이머를 이용하여 수행하였다: FOXP3-F, 5'-AGC CTG CTC CAT ACC TTG AA-3'(서열번호 1); FOXP3-R, 5'-GCC CAA GAT GTG CAC TGATA-3'(서열번호 2); GAPDH-F, 5'-TTC ACC ACC ATG GAG AAG GC-3'(서열번호 3); GAPDH-R, 5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GA-3'(서열번호 4). dsDNA-특이적 결합 염료로서의 SYBR Green I 및 지속적 형광 모니터링을 이용하여 GeneAmp 7300 서열 검출 시스템(Applied Biosystems, Foster City, CA) 상에서 실시간 PCR을 수행하였다.

[0048] **생체 내 종양 모델**

[0049] 처치 전(day 0), C57BL/6, $Foxp3^{EGFP}$ C57BL/6 또는 nu/nu 마우스를 우측 옆구리에 1×10^4 EL-4 림프종 세포로 피하주사하였다. CD4+CD25+ Treg 세포의 감소를 유도하기 위하여, 항-CD25 Abs (hybridoma clone PC61; 500 μg)를 상기 처치 3일 전(day -3), 2일 전, (day -2) 및 1일 전(day -1)에 복강 내 투여하였다. 그리고 메틸 갈레이트(200 μg) 또는 식염수를 종양 주사 후 5일째부터 주당 3회 복강 내 주사하였다. 모든 마우스는 임의 추출되었고, 처치 전 귀에 태깅되었다. 종양을 대략 주당 3회 2개의 수직 지름에서 측정하였고, 부피를 하기 식을 이용하여 계산하였다:

[0050] 부피 = $\pi/6 \times d_1^2 \times d_2$ ($d_1 < d_2$)

[0051] **종양으로부터 단일-세포 현탁액 제조**

[0052] 주사 후 21일째, 종양을 마우스로부터 제거하여 효소 분해를 통하여 단일-세포 현탁액을 제조하였다. 절개된 종양을 메스로 잘게 갈고, 그 후 0.25-g 부분 표본을 10 ml 분해 혼합물(5% FBS in RPMI 1640, 0.5 mg/ml 콜라게나제 A [Sigma-Aldrich, St. Louis, MO], 0.2 mg/ml 히알루로니다제 타입 V [Sigma-Aldrich], 및 0.02 mg/ml DNase I [Sigma-Aldrich])에 담구었다. 상기 혼합물을 그 후 회전 플랫폼 상에서 45분동안 37℃ 에서 배양하고 그 후 제조된 세포 현탁액을 70- 및 40-μm 세포 여과기(BD Biosciences)를 통하여 순차적으로 여과하고 5% FBS in RPMI 1640로 세척하였다. 마지막으로 RBC를 암모늄 클로라이드 용액에서 잠시 배양함으로써 분해하고 세포 잔해를 원심분리로 제거하였다.

[0053] **유세포 분석기 분석**

[0054] 분리된 CD4+CD25+ Treg 세포를 72시간 동안 50 μg/ml 메틸 갈레이트로 처리하고 암실에서 4℃에서 30분 동안 최적 농도의 PE-표지된 mAb와 함께 배양하였다. 세포를 3회 세척하고 유세포 분석기 버퍼(2% FBS 및 0.1%

NaN_3를 포함하는 PBS with)에 의하여 재현탁하였다. $Foxp3^{EGFP}$ C57BL/6 마우스로부터 획득한 단일-세포 현탁액 및 스플레노사이트(splenocyte)를 표준 염색 방법을 이용하여 항-CD4 PE 미 항-CD25 알로피코시아닌 mAb로 표지하였다. 그리고 특정 시약으로 염색된 세포의 퍼센트를 CellQuest software (BD Biosciences)를 이용하여 FACSCalibur로 분석하였다.

[0055] **공초점 현미경 이미지 분석**

[0056] $Foxp3^{EGFP}$ C57BL/6 마우스로부터의 림프종 조직을 Tissue-Tek OCT 화합물에 넣고 동결한 후 크라이오 스탯(cryostat)를 이용하여 20-μm-두께 박편으로 절단하였다. 표본은 LSM 5 PASCAL 공초점 레이저-스캐닝 현미경 시스템(Carl Zeiss SMT, Berlin, Germany) 으로 분석하였다. 향상된 GFP (EGFP) 양성 세포의 개수를 6개의 림프종 박편에서 계수하고 그룹 간 차이를 스튜던트 t 테스트를 이용하여 확인하였다.

[0057] **통계적 분석**

[0058] 데이터의 통계적 분석을 Prism 3.02 software (GraphPad Software, San Diego, CA)를 이용하여 수행하였다. 모든 수치는 평균±SEM으로 표현되었다. 대조군 및 처리군 표본 평균 사이의 차이를 one-way ANOVA 또는 스튜던트 t 테스트로 결정하였다. $p < 0.05$는 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다.

[0059] <실험 결과>

[0060] **메틸 갈레이트는 Treg 세포 이동을 저해한다.**

[0061] 메틸 갈레이트가 종양으로의 CD4+CD25+ Treg 세포의 이동을 저해하는지를 확인하기 위하여, 마우스의 스플레노사이트로부터 정제된 CD4+CD25+ Treg 세포를 이용하여 시험관 내 이동 어세이를 수행하였다. 트랜스웰 이동 어세이 결과 EL-4 세포 상등액을 포함하는 챔버로의 CD4+CD25+ Treg 세포의 이동이 10 μg/ml 농도의 메틸 갈레이트 처리에 반응하여 최대 31% 만큼 감소하였다는 것을 확인하였다. CD4+ CD25+ Treg 세포의 이동은 또한 50 μg/ml 농도의 메틸 갈레이트 처리에 반응하여 73%만큼 감소하였다(도 1A). 이러한 결과는 메틸 갈레이트가 종양 환경 인자로의 CD4+ CD25+ Treg 세포의 이동을 억제한다는 것을 의미한다.

[0062] **CD4+CD25+ Treg 세포의 표면 분자 및 세포 독성에 대한 메틸 갈레이트의 효과**

[0063] CD4+CD25+ Treg 세포 기능에 대한 메틸 갈레이트의 효과를 평가하기 전에 메틸 갈레이트 처리에서 CD4+CD25+ Treg 세포의 표현형을 확인하기 위하여, 유세포 분석기를 이용하여 CD69, CTLA-4, GITR, CCR4, CCR5, CXCR3, 및 CXCR4를 포함하는 표면 마커 발현을 평가하였다. 그 결과 메틸 갈레이트 처리군(23.13 ± 0.90%, 3.91 ± 2.04%, 3.92 ± 0.67%, 각각) 및 대조군 (24.18 ± 3.72%, 3.42 ± 0.06%, 4.16 ± 2.13%, 각각) 사이에 CD69, CXCR3, 및 CCR5 발현 양에 있어서는 아무런 차이를 나타내지 않았다. 그러나, 메틸 갈레이트-처리된 CD4+CD25+ Treg 세포(2.52 ± 0.60%, 3.56 ± 1.04%, 13.24 ± 0.64%, 40.13 ± 2.54%, 각각) 는 대조군(6.82 ± 0.69%, 9.70 ± 1.04%, 17.90 ± 1.36%, 75.47 ± 2.21%, 각각)보다 CTLA-4, CCR4, CXCR4, 및 GITR의 퍼센트가 더 낮았다(도 1B). 메틸 갈레이트의 CD4+CD25+ Treg 세포에 대한 세포 독성 능력을 결정하기 위하여, Cell Titer 96 비방사능 세포 증식 어세이를 다양한 농도(0-50 μg/ml)의 메틸 갈레이트에서 수행하였다. 도 1C에 나타난 바와 같이, 메틸 갈레이트 처리는 CD4+CD25+ Treg 세포에 아무런 세포 독성을 나타내지 않았다.

[0064] 다양한 암에서의 CXCR4, CCR7, CXCR5, CXCR3, 및 CCR5 와 같은 케모카인 수용체의 발현은 암 전이와 연관되어 왔다. 그 중 CXCR4는 림프절 수송 네트워크를 이용하는 주요 전이-조절 수용체인 것으로 알려져 있고, CCR4+ Treg 세포는 인간 종양을 침윤시키고 종양-침윤 이펙터 T 세포의 항종양 활성을 억제하는 것으로 알려져 있다. 또한, Treg 세포상의 GITR을 통한 신호전달은 T 세포 증식을 억제하는 활성을 직접적으로 저해하는 것으로 알려져 있다.

[0065] **메틸 갈레이트에 의한 Foxp3 발현 저해**

[0066] 메틸 갈레이트 처리에 의한 Foxp3 발현을 평가하기 위하여, Haribhai et al. (Haribhai, D., W. et al., J. Immunol. 178: 2961-2972, 2007.)에서 처음 설명된 $Foxp3^{EGFP}$ C57BL/6 마우스를 사용하였다. 상기 마우스는 내인성 Foxp3 프로모터의 조절 하에서 EGFP 를 공동 발현하는 바이시스트론(bicistronic) Foxp3 로커스를 이용하여 유래되었으며, CD4+CD25+ Treg 세포에서 주요 전사 인자인 Foxp3를 형광 신호를 이용하여 실시간으로 분석할 수 있다. Foxp3 발현 정도를 시각화하고 정량하기 위하여 $Foxp3^{EGFP}$ 마우스 유래 CD4+CD25+ Treg 세포를 이용하여 유세포 분석을 수행하였다. $EGFP^{high}$ 형광 신호는 메틸 갈레이트 처리에 반응하여 ~86.5% 만큼 감소하였다(도 1D).

[0067] 또한, 실시간 PCR을 이용하여 Foxp3의 mRNA 발현 수준을 측정하였다. 50 μg/ml 메틸 갈레이트로 처리하면 Foxp3 발현이 47%만큼 억제되었고(도 1E), 이는 메틸 갈레이트의 CD4+CD25+ Treg 세포에 대한 억제 효과가 CD4+CD25+ Treg 세포에서의 감소된 Foxp3 발현에 기인한다는 것을 의미한다.

[0068]

[0069] **메틸 갈레이트는 CD4+CD25+ Treg 세포의 억제 효과를 저해한다.**

[0070] 본 발명자들은 메틸 갈레이트가 CD4+ CD25- T 세포에 대한 CD4+CD25+ Treg 세포의 억제 효과를 조절할 수 있는지를 측정하였다. CD4+CD25- T 세포는 CFSE로 표지되고 메틸 갈레이트로 전처리된 CD4+CD25+ Treg 세포와 공동 배양되었다. 7일 후, 상기 혼합된 세포들을 항-CD25 Ab로 염색하고, 반응 세포의 평균 형광 강도 퍼센트를 측정하였다. 그 결과, 메틸 갈레이트-처리된 CD4+CD25+ Treg 세포의 억제 기능은 CD4+ CD25- T 세포의 증식이 증가함에 의하여 현저하게 감소되었다(도 1F). 이러한 결과는 메틸 갈레이트가 시험관 내에서 CD4+CD25+ Treg 세포 기능에 대한 저해 효과를 가짐을 강하게 암시하는 것이다.

[0071] **메틸 갈레이트는 EL-4 종양 세포 주기에 영향을 미치지 않는다.**

[0072] 메틸 갈레이트가 EL-4 세포에 대한 직접적인 저해 효과를 가지는지 여부를 확인하기 위하여, 다양한 농도(0-50 μg/ml)의 메틸 갈레이트를 이용하여 종양 세포 주기 분석을 수행하였다. 도 2에서 확인할 수 있는 바와 같이, DNA 유세포 분석을 통하여 메틸 갈레이트 처리가 어떠한 특이적인 세포 주기 정지를 유도하지 않음을 확인하였다.

[0073] **메틸 갈레이트는 EL-4 림프종 모델에서 종양 성장을 감소시키고 장기 생존율을 개선시킨다.**

[0074] 스크리닝 어세이로서, 본 발명자들은 7가지의 종양 세포주(CMT, 마우스 폐 선암; M-3, 마우스 흑색종; HEPA, 마우스 간세포암; RAG, 마우스 선암; MTV, 마우스 유방암; EL-4, 마우스 림프종; B16, 마우스 흑색종)의 이동 어세이를 수행하였다. 메틸 갈레이트 모든 세포주에서 30-50% Treg 이동을 효과적으로 저해하였다. 그러나, EL-4 세포주가 C57BL/6 마우스에서의 종양 발생에 효과적이기 때문에 선택되었다. 10^4 세포/동물의 주사로 피하 EL-4 림프종이 각각의 숙주, C57BL/6 마우스에 확립되었다. 메틸 갈레이트 종양 주사 후 5일 째부터 주당 3회 복강 내 주사되었다. 처리되지 않은 대조군(EL-4)의 마우스는 종양 이식 38 내지 70일 사이에 모두 죽었다. 그러나 메틸 갈레이트-처리된 군은 90일에 ~20%의 생존율을 나타내었다(도 3A-C).

[0075] **nu/nu 및 Treg 세포-감소된 마우스에서의 종양 성장 및 생존에 대한 메틸 갈레이트의 효과**

[0076] 종양 퇴행 및 생존에 있어서 Treg 세포와 메틸 갈레이트 사이의 관계가 있는지를 확인하기 위하여, T 세포-결핍 누드 마우스(nu/nu)를 사용하여 항종양 효과를 측정하였다. 10^4 세포/동물의 주사로 nu/nu 마우스에 EL-4 림프종이 확립되었다. 대조군과 비교하였을 때 메틸 갈레이트-처리된 군에서 종양 성장의 현저한 퇴행 또는 지연을 관찰할 수 없었다(도 3D). 또한 메틸 갈레이트-처리된 마우스에서 전체 생존 시간의 현저한 연장을 관찰할 수 없었다(도 3E). 또한, 종양 성장에 있어서 Treg 세포의 역할을 확인하기 위하여 종양 퇴행에 대한 항-CD25 Ab (PC61)의 효과를 측정하였다. 특히, B6 마우스에 EL-4 종양 주사를 하기 전 3일 동안 PC61를 주사하여, 단독의 PC61 주사가 종양 성장의 현저한 저해를 야기한다는 것을 확인하였다. 그러나, 도 3A에서 확인할 수 있는 바와 같이, 메틸 갈레이트는 PC61 처리군에서 종양 성장 및 생존율을 저해하지 않았다. 이는 메틸 갈

레이트에 의한 종양 퇴행은 Treg 세포의 조절에 의하여 매개되는 것임을 나타낸다(도 3A-C).

[0077] **메틸 갈레이트는 비장의 CD4+CD25+ Foxp3+ Treg 세포, 및 CD4+CD25+ Treg 세포의 종양 침윤을 억제한다.**

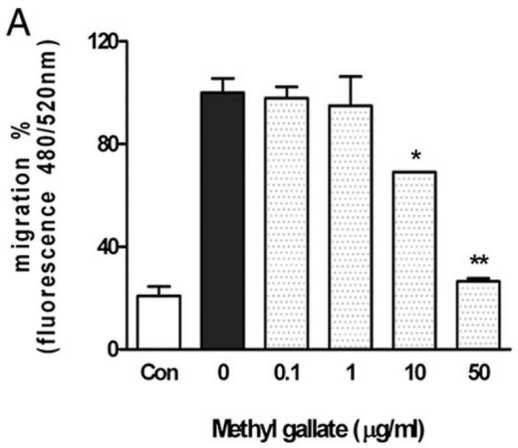
[0078] 메틸 갈레이트의 CD4+CD25+ Treg 세포에 대한 생체 내 효과를 확인하기 위하여, Treg 세포에서의 Foxp3 발현이 암-보유 $Foxp3^{EGFP}$ 마우스의 스플레노사이트에서 분석되었다. 유세포 분석은 종양 주사 후 21일째 희생된 $Foxp3^{EGFP}$ 마우스 유래의 스플레노사이트를 이용하여 수행되었다. 그 후 상기 스플레노사이트를 항-CD4 PE 및 항-CD25 알로피코시아닌으로 면역형광 염색하고, 그 후 EGFP 신호를 분석하였다. 메틸 갈레이트-처리된 군은 대조군과 비교하였을 때 CD4+CD25+ Treg 세포의 퍼센트가 3.35 ± 0.14% 에서 3.1 ± 0.15% 로 감소하였다. 그러나, 이러한 감소는 통계적 유의적 수준에 도달하지 않았다. 반대로, Foxp3 녹색 형광의 강도는 CD4+CD25+ Treg 세포에서 56.7%만큼 현저하게 감소하였다(도 4A). 따라서, 메틸 갈레이트 처리는 암-보유 마우스의 비장에서 CD4+CD25+ $Foxp3^{high}$ Treg 세포의 현저한 감소를 유도하였다. 메틸 갈레이트의 CD4+CD25+ Treg 세포 이동에 대한 효과를 확인하기 위하여, 종양 침윤 CD4+CD25+ Treg 세포의 발현을 $Foxp3^{EGFP}$ 마우스의 종양에서 분석하였다. 유세포 분석을 종양 주사 후 21일째 희생된 $Foxp3^{EGFP}$ 마우스 유래 종양을 이용하여 수행하였다(도 4B). 상기 종양 현탁액을 항-CD25 PE에 대하여 면역형광염색하고 $Foxp3^{EGFP}$ 를 분석하였다. 메틸 갈레이트 처리는 대조군과 비교하였을 때 CD25+ Foxp3+ Treg 세포에 있어서 0.35 ± 0.05% 로부터 0.20 ± 0.02%까지 42.9% 감소를 일으켰다.

[0079] **EL-4 림프종에서의 $Foxp3^{EGFP}$ 이미지 분석**

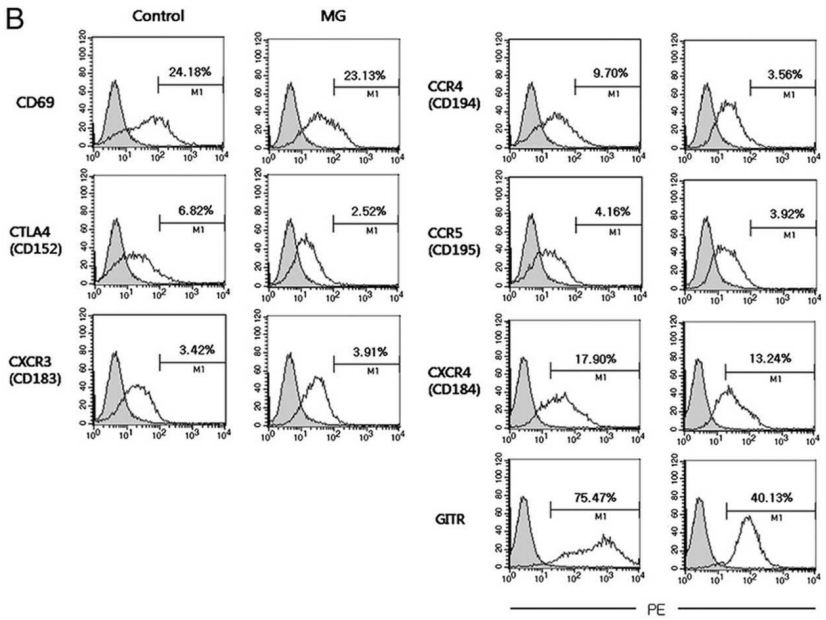
[0080] 메틸 갈레이트의 CD4+CD25+ Treg 세포 이동에 대한 효과를 확인하기 위하여, 종양 주사 후 21일 째 희생된 $Foxp3^{EGFP}$ 마우스 유래의 림프종 조직을 크라이오스탯으로 박편하여 공초점 현미경 관찰하였다. 종양 침윤 Foxp3 양성 세포의 확장이 메틸 갈레이트-처리된 마우스 군에서 감소하였고(도 5A), Foxp3 양성 세포의 개수 역시 정상 마우스이 종양 조직에서의 그것과 비교하였을 때 현저하게 감소하였다(도 5B).

도면

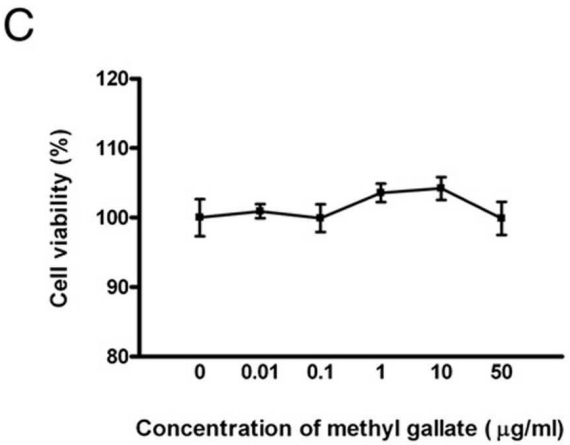
도면1a



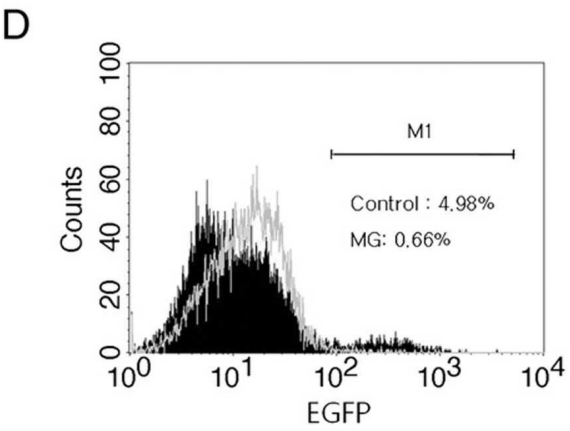
도면1b



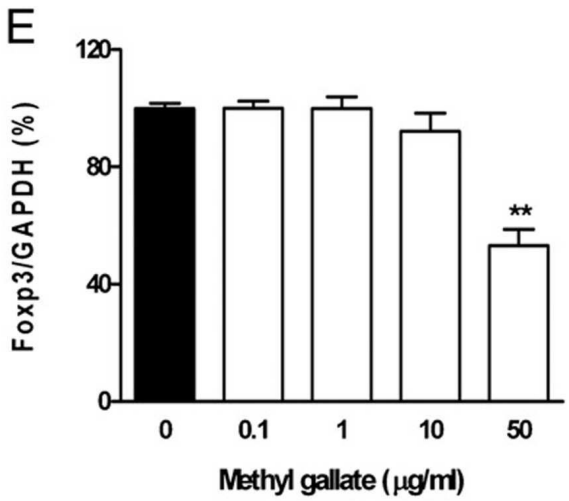
도면1c



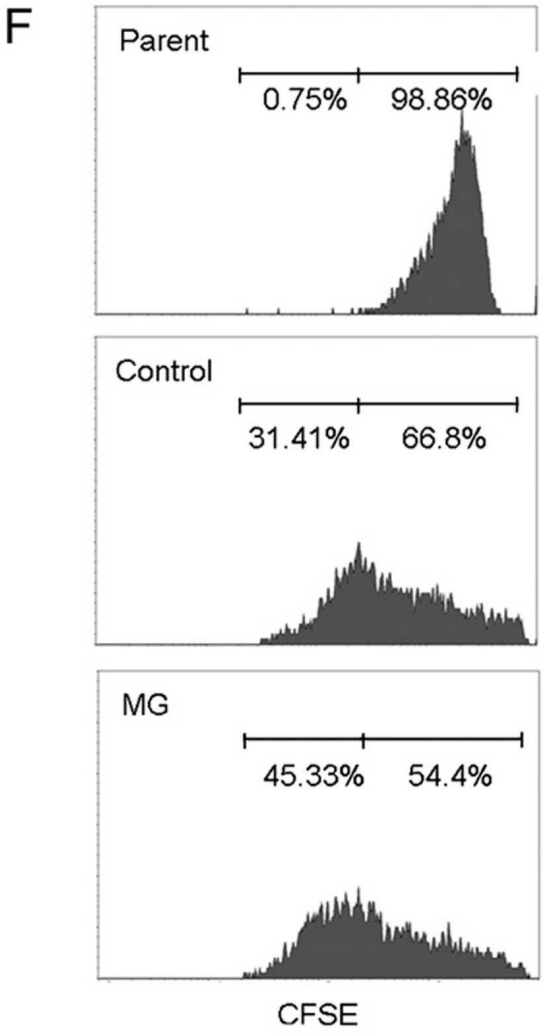
도면1d



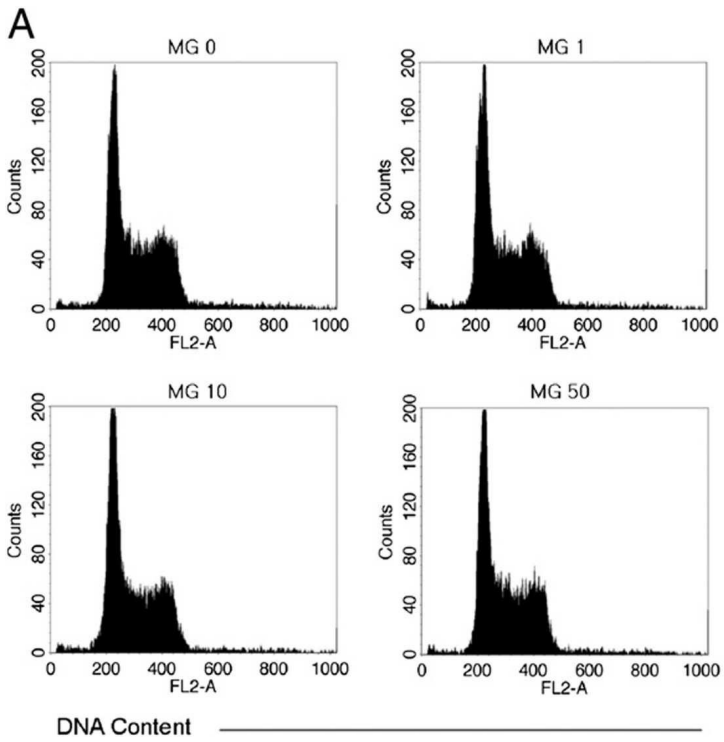
도면1e


E
120
80
40
0
Foxp3/GAPDH (%)
**
0
0.1
1
10
50
Methyl gallate (μg/ml)

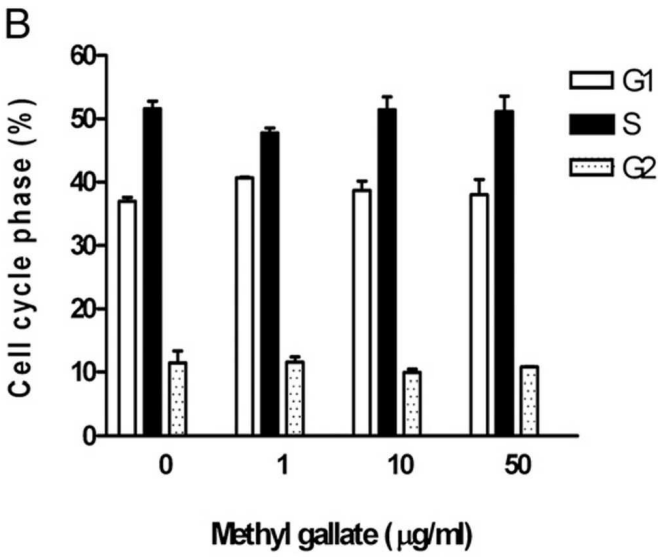
도면1f


F
Parent
0.75%
98.86%
Control
31.41%
66.8%
MG
45.33%
54.4%
CFSE

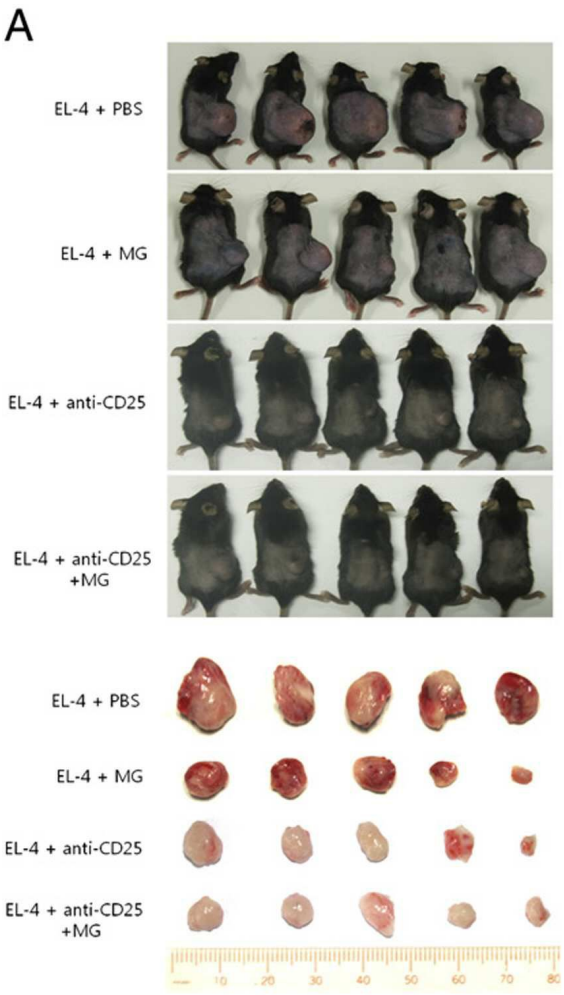
도면2a


A
MG 0
MG 1
MG 10
MG 50
Counts
FL2-A
0
40
80
120
160
200
400
600
800
1000
DNA Content

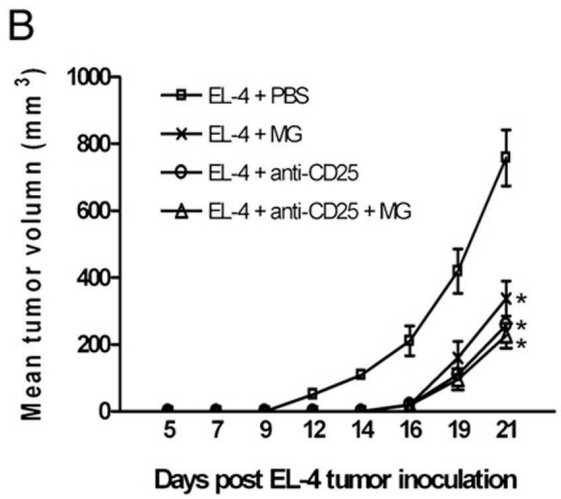
도면2b


B
Cell cycle phase (%)
G1
S
G2
0
10
20
30
40
50
60
0
1
10
50
Methyl gallate (μg/ml)

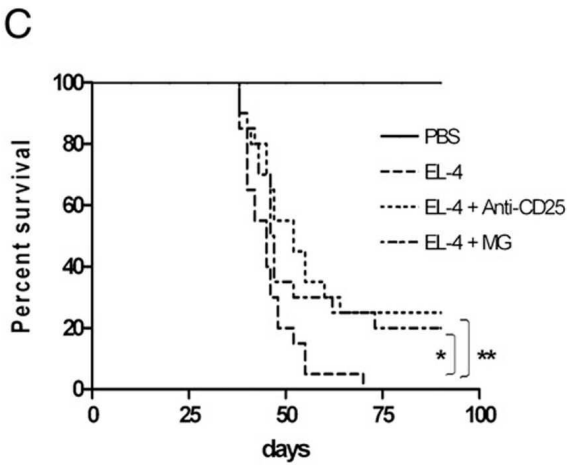
도면3a


A
EL-4 + PBS
EL-4 + MG
EL-4 + anti-CD25
EL-4 + anti-CD25 +MG
EL-4 + PBS
EL-4 + MG
EL-4 + anti-CD25
EL-4 + anti-CD25 +MG

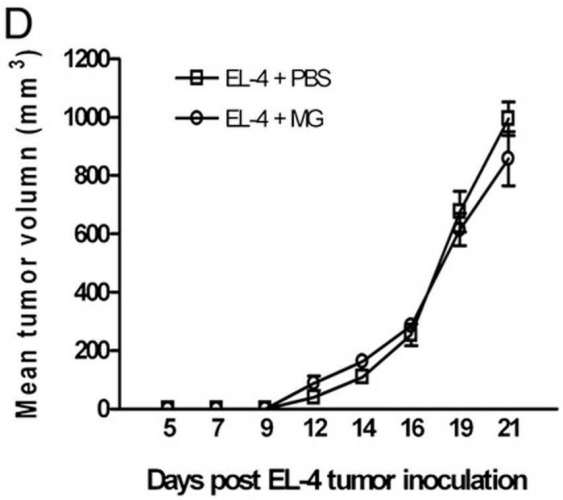
도면3b


B
Mean tumor volumn (mm3)
1000
800
600
400
200
0
EL-4 + PBS
EL-4 + MG
EL-4 + anti-CD25
EL-4 + anti-CD25 + MG
5
7
9
12
14
16
19
21
Days post EL-4 tumor inoculation

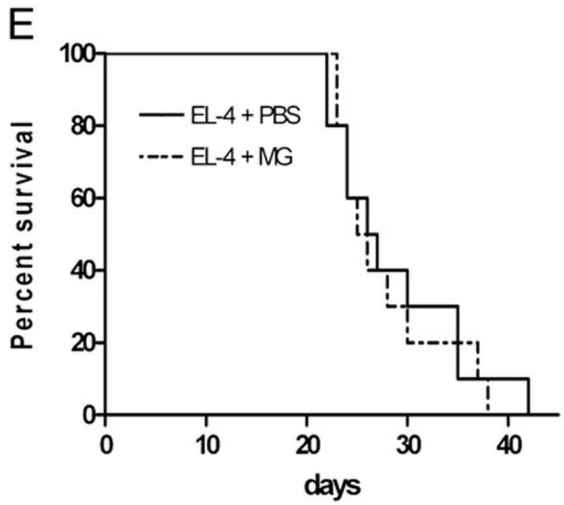
도면3c



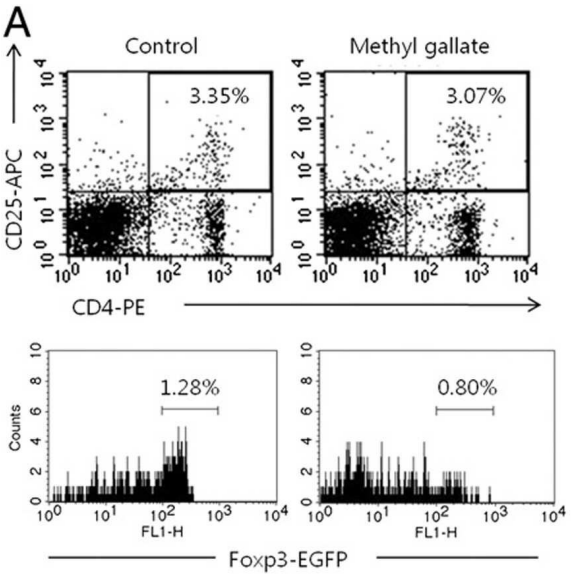
도면3d



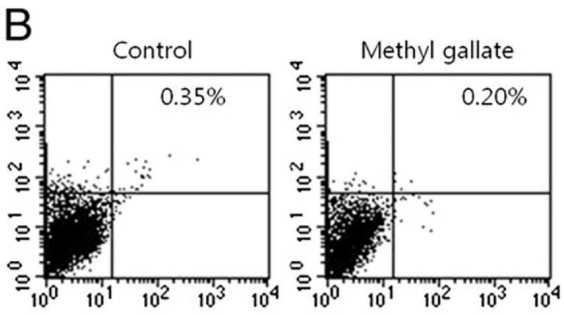
도면3e



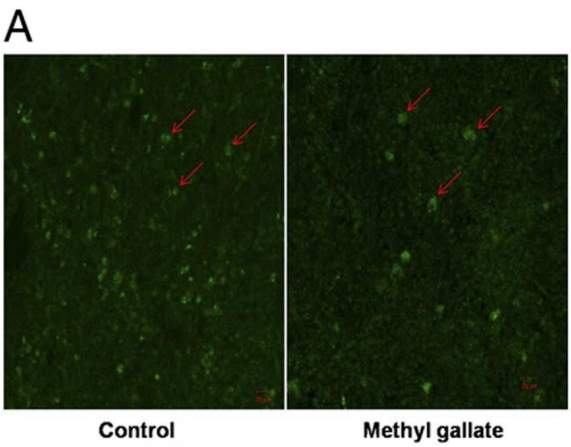
도면4a



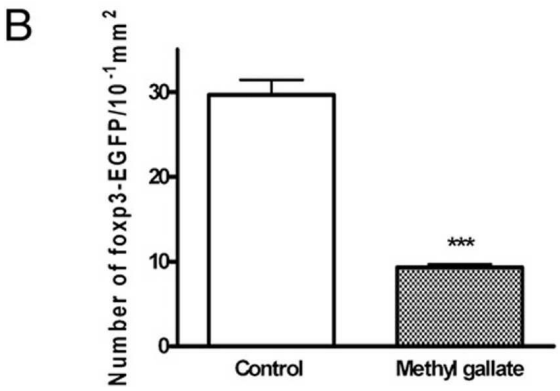
도면4b



도면5a



도면5b



서 열 목 록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> Pharmaceutical composition for inhibiting regulatory T cell activity comprising methyl gallate

<130> PA110041/KR

<160> 4

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FOXP3 forward primer

<400> 1

agcctgctcc ataccttgaa 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FOXP3 reverse primer

<400> 2

gcccaagatg tgcactgata 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAPDH forward primer

<400> 3

ttcaccacca tggagaaggc 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAPDH reverse primer

<400> 4

ggcatggact gtggtcatga 20