



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0133114
(43) 공개일자 2018년12월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 39/395 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)

G01N 33/50 (2017.01) G01N 33/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 39/395 (2013.01)

A61K 39/39558 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0069642

(22) 출원일자 2017년06월05일

심사청구일자 2017년06월05일

(71) 출원인

울산대학교 산학협력단

울산광역시 남구 대학로 93(무거동)

(72) 발명자

권병석

울산광역시 중구 우정3길 9, 108동 501호 (우정동, 선경1차아파트)

조홍래

울산광역시 동구 봉수로 450, 110동 1702호 (서부동, 서부성원상떼빌)

강상욱

울산광역시 남구 옥현로 92-13, 206동 102호 (무거동, 옥현주공1단지아파트)

(74) 대리인

특허법인태백

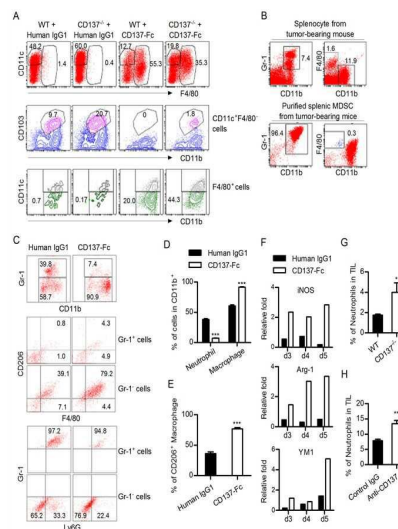
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 CD137 리간드 차단제를 유효성분으로 함유하는 항암면역 치료용 약학조성물

(57) 요약

본 발명은 CD137 리간드 차단제를 유효성분으로 함유하는 항암면역 치료용 약학조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게 항-CD137 항체는 면역반응이 억제된 종양 세포 내 CD137 리간드를 차단함으로써, 세포독성 CD8⁺ T 림프구 (Tc1s), CD103⁺ 수지상세포(DC) 및 1형 종양 관련 대식세포(TAM)로 이루어진 군에서 선택되는 면역관련 세포의 분화를 유도시켜, 종양 세포의 면역반응을 회복시키는 것이 확인됨에 따라, 항-CD137 항체를 CD137 리간드 차단제로 제공하여 항암면역 치료 효과를 향상시킬 수 있다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

G01N 33/5011 (2013.01)
G01N 33/6866 (2013.01)
G01N 33/6869 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
G01N 2333/5434 (2013.01)
G01N 2333/57 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2014R1A2A2A01005652
 부처명 미래창조과학부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 핵심연구지원사업
 연구과제명 CD137-CD137L 양방신호 네트워크에 의한 종양 면역관용조절
 기 여 율 50/100
 주관기관 울산대학교 산학협력단
 연구기간 2014.05.01 ~ 2017.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2015R1A2A1A15055810
 부처명 미래창조과학부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 핵심연구지원사업
 연구과제명 종양미세환경 조절을 통한 암치료법 개발
 기 여 율 50/100
 주관기관 울산대학교 산학협력단
 연구기간 2015.05.01 ~ 2017.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

CD137 리간드 차단제를 유효성분으로 함유하는 항암면역 치료용 약학조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 CD137 리간드 차단제는 단일클론항체 항-CD137 또는 항-CD137 리간드인 것을 특징으로 하는 항암면역 치료용 약학조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 CD137 리간드 차단제는 종양 세포 내 CD137 리간드를 차단하여 세포독성 $CD8^{+}$ T 림프구(cytotoxic $CD8^{+}$ T lymphocytes; TcIs), $CD103^{+}$ 수지상세포(dendritic cell) 및 1형 종양 관련 대식세포(type 1 tumor-associated-macrophage; TAM)으로 이루어진 군에서 선택되는 면역관련 세포의 분화를 유도하여 종양 내 면역반응을 회복시키는 것을 특징으로 하는 항암면역 치료용 약학조성물.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 $CD103^{+}$ 수지상세포(dendritic cell) 또는 1형 종양 관련 대식세포(type 1 tumor-associated-macrophage; TAM)는 종양 내 IL-12 수준을 증가시키는 것을 특징으로 하는 항암면역 치료용 약학조성물.

청구항 5

청구항 3에 있어서, 상기 세포독성 $CD8^{+}$ T 림프구는 종양 내 IFN- γ 수준을 증가시키는 것을 특징으로 하는 항암면역 치료용 약학조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 암은 식도암, 폐암, 췌장암, 갑상선암, 위암, 소장암, 결장암, 직장암, 간암, 방광암, 신장암, 유방암, 자궁암, 자궁경부암, 난소암, 림프종, 전립선암, 골육종 및 백혈병으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 항암면역 치료용 약학조성물.

청구항 7

종양 세포에 후보물질을 처리하는 단계;

상기 후보물질이 처리된 종양 세포 내 $CD8^{+}$ T 림프구, $CD103^{+}$ 수지상세포(dendritic cell) 및 1형 종양 관련 대식세포(type 1 tumor-associated-macrophage; TAM)의 발현 수준을 확인하는 단계; 및

상기 발현 수준을 대조군과 비교하는 단계를 포함하는 CD137 리간드 차단제 스크리닝 방법.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 후보물질이 처리된 종양 세포 내 세포독성 $CD8^{+}$ T 림프구, $CD103^{+}$ 수지상세포 및 1형 종양 관련 대식세포 수준은 대조군보다 증가된 것을 특징으로 하는 CD137 리간드 차단제 스크리닝 방법.

청구항 9

청구항 7에 있어서, 상기 항암면역 치료제 스크리닝 방법은 후보물질이 처리된 종양 세포에서 IL-12 및 IFN- γ 증가 수준을 확인하는 단계를 추가로 더 포함하는 것을 특징으로 하는 CD137 리간드 차단제 스크리닝 방법.

청구항 10

청구항 7 내지 청구항 9중 어느 한 항의 스크리닝 방법으로 선별된 CD137 리간드 차단제를 유효성분으로 함유하는 암질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 CD137 리간드 차단제를 유효성분으로 함유하는 항암면역 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 기존의 항암 면역요법은 암세포를 직접 타겟으로 하는 것이 주를 이루었으나, 2000년 이후 CpG DNA 암백신 또는 암항원에 대한 특이적 백신등에 대한 연구가 이루어졌다. 그러나 상기 항암 면역요법은 이론상으로 암세포를 괴멸시키는 것이 가능하나 임상적으로 항암작용 효과가 제한되고 다양한 부작용이 나타났다.

[0003] 최근에는 자연살해세포나 T 세포 등을 이용한 면역치료법이 시도되고 있으나, 암환자의 면역세포가 제 기능을 발휘하지 못하는 경우가 많다.

[0004] 암세포는 면역학적 관문 수용체에 신호를 보내는 '면역관문 리간드'를 발현해 T 세포가 정상적인 활동을 하지 못하도록 방해하는데, '면역학적 관문'이란 면역 체계의 다양한 억제적 신호 전달체계를 말하며, 이는 몸 속에서 일어나는 무차별적 조직피해를 막기 위한 자가 관용과 면역조절의 강도 및 시기 조절에 관여한다.

[0005] 따라서 면역관문 억제제를 이용하여 암세포 내 면역관문 리간드와 수용체의 상호 작용을 차단하면, T 세포의 기능이 활성화되고 활성화된 T 세포가 암세포를 공격함으로써 항암 치료 효과를 향상시킬 수 있다.

[0006] CD137 유전자는 면역세포인 T 림프구의 표면에 발현되어 T 림프구가 항원 제시세포와 결합할 때 수용기 역할을 하는 유전자로서, 종양괴사인자 수퍼패밀리 멤버 9(tumor necrosis factor receptor superfamily member 9; TNFRSF9) 또는 4-1BB로도 불린다. 상기 CD137은 T 세포의 활성화에 의해 발현될 수 있으나, CD4 T 세포에 비해 CD8 T 세포에서 넓게 증식된다.

[0007] CD137의 발현은 수지상세포, 여포성 수지상세포, 자연 살해 세포, 과립성 백혈구 및 염증 부위의 혈관벽 세포들에서도 발견되며, 결합을 통하여 T 세포 증식, IL-2 분비 및 세포 용해 활성을 증가시킨다.

[0008] 그러나 아직까지 암치료에 있어, CD137/CD137 리간드(CD137L) 신호 차단에 의한 효과에 대해서는 보고된 바가 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제2008-0090403호 (2008.10.08 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 암세포에서 면역관문 리간드 역할을 하는 CD137 리간드(CD137L)의 신호 차단 억제제를 제공하여 면역반응이 억제된 암세포의 면역반응을 활성화시킴으로써 항암 치료 효과를 향상시키고자 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 CD137 리간드 차단제를 유효성분으로 함유하는 항암면역 치료용 약학조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명은 종양 세포에 후보물질을 처리하는 단계; 상기 후보물질이 처리된 종양 세포 내 CD8⁺ T 림프구, CD103⁺ 수지상세포(dendritic cell) 및 1형 종양 관련 대식세포(type 1 tumor-associated-macrophage; TAM)의 발현 수준을 확인하는 단계; 및 상기 발현 수준을 대조군과 비교하는 단계를 포함하는 CD137 리간드 차단제 스크리닝

방법을 제공한다.

[0013] 또한, 상기 스크리닝 방법으로 선별된 CD137 리간드 차단제를 유효성분으로 함유하는 암질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 따르면, 항-CD137 항체는 면역반응이 억제된 종양 세포 내 CD137 리간드를 차단함으로써, 세포독성 CD8⁺ T 림프구(Tc1s), CD103⁺ 수지상세포(DC) 및 1형 종양 관련 대식세포(TAM)와 같은 면역반응을 유도하는 세포를 분화시켜, 종양 세포의 면역반응을 회복시키는 것이 확인됨에 따라, 항-CD137 항체를 CD137 리간드 차단제로 제공하여 항암면역 치료 효과를 향상시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 CD137^{-/-} 생쥐 및 항-CD137-항체가 주입된 생쥐에서 침투성 항종양 면역 유도를 확인한 결과로, 항-CD137-항체는 종양 세포 주입 5 또는 6일에 생쥐에 주입하였고, 항-CD8-항체는 0 일부터 5일 간격으로 계속 주입하였다. 비장은 14-16일째에 분석하였다. 도 1A 및 1D는 종양 성장 곡선이며 (***P < 0.001, n = 5-6/group), 도 1B 및 도 1E의 왼쪽은 비장 내 CD44^{hi}CD62L^{lo} 인 활성화된 CD4 또는 CD8 T 세포를 확인한 FACS 스팟 플롯 결과이며, 오른쪽은 각 CD4 또는 CD8 세포 내 CD44^{hi}CD62L^{lo} 세포를 백분율로 나타낸 결과이며 (*P < 0.05; **P < 0.01, n = 5-6/group), 도 1C 및 1F는 Tc1 세포 활성을 확인한 것으로, 항원 표지된 종양세포와 비장 CD8⁺ T 세포를 공동배양 후, CD107a 염색한 결과로, 왼쪽은 CD8⁺ T 세포 내 염색된 CD107a를 FACS 스팟 플롯 결과이고, 오른쪽은 CD8⁺ T 세포 내 CD107a⁺ 세포를 백분율로 나타낸 결과이며 (*P < 0.05; ***P < 0.001, n = 4/group), 도 1G는 CD137^{-/-} 생쥐 및 항-CD137가 주입된 생쥐에 CD8⁺ T 세포 제거 시 종양 성장이 회복된다 (***P < 0.001; n = 4/group).

도 2는 CD137^{-/-} 생쥐 및 항-CD137-항체가 주입된 생쥐의 종양 내 CD103⁺ DC와 M1-like TAM 증가를 확인한 결과로, 도 2A 및 2E는 종양세포 주사 후 9 또는 10일째 축합된 종양 용해물내 (n=4/group)에서 CD103⁺와 CD11b⁺ DC를 확인한 것으로, 왼쪽은 CD45⁺MHC II^{hi}F4/80⁻CD11c⁺인 CD103⁺ DC 및 CD11b⁺ DC를 확인한 FACS 스팟 플롯 결과이며, 오른쪽은 DCs 중 CD103⁺ DC의 비율을 CD11b⁺ DC의 비율로 나눈 값이며, 도 2B 및 2F는 종양세포 주사 후 9 또는 10일째 세포내 IL-12 염색한 결과로, CD45⁺MHC II^{hi}F4/80⁻CD11c⁺ DC 내 IL-12를 나타내는 FACS 스팟 플롯 결과이며, 도 2C 및 2G는 종양세포 주사 후 16일째 종양에서 TAM를 확인한 것으로, 왼쪽은 CD45⁺Gr-1⁻CD11b⁺F4/80⁺인 CD206⁺ TAM를 확인한 FACS 스팟 플롯 결과이며, 오른쪽은 TAM 중 CD206⁻ 세포의 비율을 CD206⁺ 세포의 비율로 나눈 값이다. 도 2D 및 2H는 종양세포 주사 후 16일째 종양에서 분리한 F4/80⁺TAM의 M1 유형 또는 M2 유형 macrophage 유전자를 qRT-PCR로 확인한 결과이다(*P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001, n = 4/group).

도 3은 CD137^{-/-} 생쥐 및 항-CD137-항체가 주입된 생쥐의 종양 내 Tc1 세포 증가를 확인한 결과로, 도 3A 및 3D는 종양 세포 주입 9 또는 10일 후 종양에서 백혈구를 분리한 후 생체 외에서 PMA 및 이오노마이신으로 자극하고, 세포 내 IFN- γ 를 염색한 결과로, 왼쪽은 CD3⁺CD8⁺ T 세포 내 염색된 IFN- γ 를 나타내는 FACS 스팟 플롯 결과이며, 오른쪽은 CD3⁺CD8⁺ T 세포 내 IFN- γ ⁺ 세포의 백분율을 나타낸 결과이며(n = 4/group), 도 3B 및 3E의 왼쪽은 활성화된 세포 내 CD62L^{lo}CD8⁺ T 세포를 확인한 FACS 스팟 플롯 결과이며, 오른쪽은 CD8⁺ T 세포내 CD62L^{lo} 세포를 백분율로 나타낸 결과이며(n = 4/group). *P < 0.05; **P < 0.01, 도 3C 및 3F는 종양 용해물 내 IFN- γ 수준을 확인한 결과이다(n = 4/group, *P < 0.05; ***P < 0.001).

도 4는 CD137 유전자 결실 또는 항-CD137 항체에 의해 유도된 종양 미세환경의 변화와 IL-12의 관련성을 확인한 결과로, 대조군 IgG 또는 항-IL-12 항체를 0, 5 및 10일째에 생쥐에 주입하였으며, 종양은 9 또는 10일째에 분석되었다. 도 4A 및 4E는 종양 내 CD3⁺CD8⁺ T 세포의 세포 내 IFN- γ ⁺CD8⁺ T 세포의 백분율 나타낸 결과이며(*P

< 0.05, n = 4/group), 도 4B 및 4F는 종양성장 곡선이며(*P < 0.05; **P < 0.01, n = 4-6/group), 도 4C 및 4G는 종양 내 CD103⁺ DCs의 FACS 스팟 플롯 결과를 CD11b⁺ DCs의 결과로 나눈 값이며, 4D 및 4H는 TAM 중 CD206⁻ 세포의 비율을 CD206⁺ 세포의 비율로 나눈 값이다(*P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001, n = 4/group).

도 5는 CD137^{-/-} 생쥐 및 항-CD137-항체가 주입된 생쥐의 종양 내 CD103⁺ DC 및 M1형 TAMs의 분화가 IFN- γ 에 의해 유도되는 것을 확인한 결과로, 대조군 IgG 또는 항-IL-12 항체를 0, 5 및 10일째에 생쥐에 주입하였으며, 종양은 9 또는 10일째에 분석되었다. 도 5A 및 5E는 종양 내 CD3⁺CD8⁺ T 세포의 세포 내 IFN- γ 를 확인한 FACS 스팟 플롯 결과이며, 도 5B 및 5F는 종양 내 FACS 스팟 플롯으로 확인한 CD103⁺ DCs/CD11b⁺ DCs 비율이며, 도 5C 및 5G는 CD206⁻ TAMs/CD206⁺ TAMs 비율이며(*P < 0.05; **P < 0.01, n = 4/group), 도 5D 및 5H는 10 또는 13일째 종양 크기를 확인한 결과이다(n = 4-6/group, *P < 0.05; ***P < 0.001).

도 6은 종양에서 조절 T 세포의 CD137 발현이 M1형 대식세포 분화 억제와 종양성장을 확인한 결과로, 종양은 14일째 분석되었다. 도 6A는 종양 내에서 CD137 발현 세포를 확인한 것으로, CD45⁺CD11b⁻, CD45⁺CD11b⁺Gr-1^{hi}, 그리고 CD45⁺CD11b⁺Gr-1^{int/-}인 세포의 CD137 발현을 FACS로 확인한 것이며, 도 4B는 종양 내 T 세포에서 CD137 발현을 확인한 것으로, CD4⁺Foxp3^{+/+} 또는 CD4⁺ T 세포에서 CD137 발현을 FACS로 확인한 것이며, 도 6C는 종양 내에서 CD45⁺CD11b⁻, CD45⁺CD11b⁺Gr-1^{hi}, 그리고 CD45⁺CD11b⁺Gr-1^{int/-}인 세포의 CD137L 발현을 FACS로 확인한 것이다. 도 6D 및 6E는 종양 세포를 접종하기 전에 WT 및 CD137^{-/-} 생쥐에 WT 조절 T 세포 또는 CD137^{-/-} 조절 T 세포를 입양세포이식하였고, 6D는 TAM 중 CD206⁻ 세포의 비율을 CD206⁺ 세포의 비율로 나눈 값이며 (**P < 0.01; ***P < 0.001, n = 4/group), 도 6E는 종양 성장 곡선이다 (*P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001, n = 4/group).

도 7은 생체 외에서 CD137L 신호에 의한 CD103⁺ DCs 및 M1 대식세포의 분화 억제를 확인한 결과로, 도 7A는 야생형 또는 CD137^{-/-} 생쥐의 골수 세포를 사람 gG1- 또는 CD137-Fc-코팅된 플레이트에서 생쥐 Flt3L가 존재하는 조건으로 7일간 배양한 후 IFN- γ 및 GM-CSF를 첨가하여 48 동안 CD103⁺ 아형으로 수지상 세포의 분화를 유도한 후 CD103⁺ DCs 분화 수준을 확인한 결과로, CD11c⁺F4/80⁻ 세포로부터 분화된 CD103⁺ DCs를 확인한 결과(중간)와, F4/80⁺CD11b⁺CD11c⁺ 또는 F4/80⁺CD11b⁺CD11c⁻인 대식세포를 확인한 결과이며(위 및 아래), 도 7B는 14일째에 CT26 종양이 형성 생쥐의 비장 골수유래 면역억제 세포(Myeloid derived suppressor cells; MDSC)의 FACS 스팟 플롯 결과이며 (위), 분리된 비장 골수유래 면역억제 세포의 FACS 스팟 플롯 결과이며, 7C는 골수유래 면역억제 세포를 GM-CSF와 코팅된 CD137-Fc 또는 대조군 사람 IgG1 (10 μ g/ml) 존재하에서 2-5일간 배양된 세포에서 비장 MDSC의 분화 전 및 분화 후를 확인한 FACS 스팟 플롯 결과이며, 도 7D는 상기 7C에서 호중구 및 대식세포의 백분율을 나타낸 결과이며, 도 7E는 4일간 배양한 후 CD206⁺ 대식세포를 확인한 결과이며, 도 7F는 2-5일 동안 배양된 세포로부터 정제된 RNA를 이용하여 수행된 qRT-PCR 결과이며 (* P < 0.05 and *** P < 0.001), 도 7G는 CD137^{-/-} 생쥐 및 항-CD137-항체가 주입된 생쥐의 14일째 종양 내에서 호중구의 FACS 스팟 플롯 결과를 백분율로 나타낸 것이다 (* P < 0.05 and *** P < 0.001, n = 4).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 본 발명은 CD137 리간드(Homo sapiens TNF superfamily member 9 (TNFSF9), mRNA, NCBI Reference Sequence: NM_003811.3; Mus musculus tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9 (Tnfsf9), mRNA NCBI Reference Sequence: NM_009404.3) 차단제를 유효성분으로 함유하는 항암면역 치료용 약학조성물을 제공할 수 있다.

[0017] 상기 CD137 리간드 차단제는 단일클론항체 항-CD137 또는 항-CD137 리간드일 수 있다.

[0018] 본 발명에서 용어 “단일클론항체”란 단일한 항원성 부위(단일 에피토프)에 대해서 지시되어 이와 특이적인 결합을 하는 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상 본 발명의 단일클론항체는 암세포 내 CD137 또는 CD137 리간드에 특이적으로 결합하여 CD137 유전자와 CD137 리간드의 결합을 차단함으로써, CD137 리간드의 면역반응 억제 신호전달이 차단되므로 암세포에 대한 면역반응이 회복될 수 있다.

- [0019] 보다 상세하게 상기 CD137 리간드 차단제는 종양 세포 내 CD137 리간드를 차단하여 세포독성 $CD8^{+}$ T 림프구(cytotoxic $CD8^{+}$ T lymphocytes; TcIs), $CD103^{+}$ 수지상세포(dendritic cell) 및 1형 종양 관련 대식세포(type 1 tumor-associated-macrophage; TAM)로 이루어진 군에서 선택되는 면역관련 세포의 분화를 유도하여 종양 내 면역반응을 회복시킬 수 있다.
- [0020] 상기 $CD103^{+}$ 수지상세포(dendritic cell) 또는 1형 종양 관련 대식세포(type 1 tumor-associated-macrophage; TAM)는 종양 내 IL-12 수준을 증가시키고, 상기 세포독성 $CD8^{+}$ T 림프구는 종양 내 IFN- γ 수준을 증가시켜 종양 내 면역반응을 회복시킬 수 있다.
- [0021] 보다 상세하게는 CD137 리간드 차단제인 항-CD137 항체는 종양 내 CD137 리간드를 차단하여 $CD103^{+}$ 수지상세포(DC) 및 1형 종양 관련 대식세포(M1-like TAMs)의 분화를 유도하여 종양 내 IL-12 수준을 증가시키며, 증가된 IL-12은 $CD8^{+}$ T 림프구의 분화를 유도하여 종양 내 IFN- γ 수준을 증가시킬 수 있다. 또한, 증가된 IFN- γ 역시 $CD103^{+}$ 수지상세포(DC) 및 1형 종양 관련 대식세포(M1-like TAMs)의 분화를 유도하여 종양 내 IL-12 수준을 증가시킬 수 있으며, 상기 과정으로 종양 세포 내 증가된 IL-12 및 IFN- γ 는 종양 사멸 $CD8^{+}$ T 세포의 활성을 증가시킴으로써 면역반응이 억제된 종양 세포에서 항암효과를 나타낼 수 있다.
- [0022] 상기 암은 식도암, 폐암, 췌장암, 갑상선암, 위암, 소장암, 결장암, 직장암, 간암, 방광암, 신장암, 유방암, 자궁암, 자궁경부암, 난소암, 림프종, 전립선암, 골육종 및 백혈병으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0023] 또한, 본 발명은 종양 세포에 후보물질을 처리하는 단계; 상기 후보물질이 처리된 종양 세포 내 세포독성 $CD8^{+}$ T 림프구, $CD103^{+}$ 수지상세포(dendritic cell) 및 1형 종양 관련 대식세포(type 1 tumor-associated-macrophage; TAM)의 발현 수준을 확인하는 단계; 및 상기 발현 수준을 대조군과 비교하는 단계를 포함하는 CD137 리간드 차단제 스크리닝 방법을 제공할 수 있다.
- [0024] 상기 후보물질이 처리된 종양 세포 내 세포독성 $CD8^{+}$ T 림프구, $CD103^{+}$ 수지상세포 및 1형 종양 관련 대식세포 수준은 대조군보다 증가된 것일 수 있다.
- [0025] 상기 항암면역 치료제 스크리닝 방법은 후보물질이 처리된 종양 세포에서 IL-12 및 IFN- γ 증가 수준을 확인하는 단계를 추가로 더 포함할 수 있다.
- [0026] 또한, 본 발명은 상기 스크리닝 방법으로 선별된 CD137 리간드 차단제를 유효성분으로 함유하는 암질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공할 수 있다.
- [0027] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 CD137 리간드 차단제를 유효성분으로 함유하는 약학조성물은 통상적인 방법에 따라 주사제, 과립제, 산제, 정제, 환제, 캡슐제, 좌제, 겔, 현탁제, 유제, 점적제 또는 액제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형을 사용할 수 있다.
- [0028] 본 발명의 다른 구체예에서, CD137 리간드 차단제를 유효성분으로 함유하는 약학조성물은 약학조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제, 향미제, 향산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0029] 구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 사용할 수 있으며, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제,

유제, 동결건조제제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기재로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0030] 본 발명의 일실시예에 따르면 상기 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 대상체로 투여할 수 있다.

[0031] 상기 CD137 리간드 차단제의 바람직한 투여량은 대상체의 상태 및 체중, 질환의 종류 및 정도, 약물 형태, 투여 경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으며 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 일실시예에 따르면 이에 제한되는 것은 아니지만 1일 투여량이 0.01 내지 200 mg/kg, 구체적으로는 0.1 내지 200 mg/kg, 보다 구체적으로는 0.1 내지 100 mg/kg 일 수 있다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고 수회로 나누어 투여할 수도 있으며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0032] 본 발명에 있어서, 상기 '대상체'는 인간을 포함하는 포유동물일 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.

[0034] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0036] <참고예> 시약 및 항체

[0037] 항-CD137(3E1), 항-CD8 (2.43) 및 항-IFN- γ (R4-6A.2) 단일클론 항체(mAbs)를 ascites에서 구입하였으며, 항-IL-12p75 mAb는 BioXcell에서 구입하였으며, 랫 IgG 및 마우스 IgG1은 Sigma Aldrich에서 구입하여 사용하였다.

[0038] 하기 결합 항체들은 BD Pharmingen, eBioscience 및 Biolegend에서 구입하였다: 항-CD4 (GK1.5), 항-CD8 (53-6.7), 항-CD11b (M1/70), 항-CD11c (N418), 항-CD25 (PC61.5), 항-CD44 (IM7), 항-CD45 (30-F11), 항-CD62L (MEL-14), 항-CD103 (M290), 항-CD107a (eBio1D4B), 항-CD137 (17B5), 항-CD137L (TKS-1), 항-CD206 (C068C2), 항-F4/80 (BM8), 항-Foxp3 (PJK-16s), 항-Gr-1(RB6-8C5), 항-IL-12/IL23 (C17.8), 항-IFN- γ (XMG1.2), 항-Ly6G (1A8) 및 항-MHC II (M5/114.15.2).

[0039] 재조합 융합 CD137-Fc 단백질은 직접 제작하였다(Kim HJ et al., 2012). Flt3 리간드, GM-CSF, 및 IFN- γ 는 PeproTech에서 구입하였으며 gp70₄₂₃₋₄₃₁ 펩타이드는 Peptron에서 합성하였다.

[0041] <실험예 1> 종양 동물모델 제작

[0042] Balb/c 생쥐를 Orientbio에서 구입하였으며, CD137^{-/-} Balb/c 생쥐는 울산대학교 동물 실험실에서 사육하였다.

[0043] 모든 동물 실험은 동물 사육과 이용 위원회의 지침서 및 승인된 실험방법에 따라 수행되었다.

[0044] 먼저, CT26 세포를 2×10^5 으로 생쥐 측면에 피하 주사하였다.

[0045] 종양 세포 접종 후 5일 또는 6일째에 종양이 형성된 생쥐 복강 내로 랫 IgG 또는 항-CD137 단일클론 항체(mAb; clone 3E1)를 주사하였으며, CD8⁺ T 세포 결핍을 위해, 0, 5, 및 10일째에 항-CD8 mAb (clone 2.43) 500 μ g을 주사하였다.

[0046] 또한, IL-12, IFN- γ , 항-IL-12p75(clone R2-9A5) 또는 항-IFN- γ (R4-6A2) mAb (500 μ g/mouse)를 0일부터 시작하여 5일 간격으로 주사하였다.

[0047] 조절 T 세포(Treg cell)의 세포이식을 위해, FACSria를 이용하여 조절 T 세포를 분리하고 종양 세포 주입 하루 전에 생쥐 당 5×10^5 세포를 생쥐의 꼬리 정맥을 통하여 주사하였다.

- [0049] <실험예 2> 세포 분리 및 세포 배양
- [0050] 비장 골수유래 면역억제 세포(Myeloid derived suppressor cells; MDSC)를 분리하기 위해, 생쥐 종양 모델의 비장으로부터 얻은 단일 세포를 부유시키고 적혈구 세포(RBC) 용해 버퍼(Sigma)를 이용하여 적혈구 세포를 용해시켰다.
- [0051] MDSC 분리 키트(Milteny biotech)를 이용하여 제조사의 프로토콜로 비장 MDSC를 분리하였다. 분리된 MDSC를 GM-CSF (10 ng/ml)와 코팅된 CD137-Fc 또는 대조군 사람 IgG1 (10 µg/ml)가 포함된 RPMI 1640 배지에 3-5일간 배양하였다.
- [0052] 골수 유래 수지상 세포(bone marrow-derived dendritic cells; BMDCs)를 얻기 위해, 대퇴골 및 경골에서 골수 세포를 수집하였다. 적혈구를 용해한 후, 웰 당 2×10^6 세포를 생쥐 Flt3L 160 ng/ml이 포함된 대조군 IgG1 또는 CD137-Fc 코팅된 플레이트에서 9일 동안 배양하였다.
- [0053] 수지상 세포(Dendritic Cells; DCs)의 CD103⁺ 아형 분극을 유도하기 위해, IFN-γ (0.1 ng/ml) 및 GM-CSF (10 ng/ml) 존재하에서 2일간 추가 배양하였다.
- [0055] <실험예 3> 유세포 분석
- [0056] 세포를 4℃에서 10분간 Fc blocker 2.4G2 (10 µg/ml)와 인큐베이션하고, 표면 마커인 특이적 항체가 포함된 FACS 버퍼(0.2% BSA가 포함된 PBS)를 이용하여 4℃에서 15분간 염색한 후, FACS 버퍼를 이용하여 세척하였다.
- [0057] 테이터는 Canto II (BD Biosciences)를 이용하여 수집되었으며 BD FACSDiva (BD Biosciences) 및 FlowJo (Tree Star)를 이용하여 분석하였다.
- [0059] <실험예 4> 종양에 침투되는 백혈구 분석
- [0060] 백혈구를 종양에 침투시키기 위해, 종양을 절개하고 2 mg/ml 콜라겐분해효소 IV 및 30 mg/ml DNase I (Sigma)로 37℃에서 45분간 분해시켰다. 그 후 적혈구를 용해시키고, 실온 조건에서 2000 rpm으로 30분간 원심분리하여 죽은 세포를 제거하였다.
- [0061] IL-12 세포 내 염색을 위해, 10 µg/ml 브레펠딘 A(Brefeldin A)가 포함된 RPMI1640 배지가 들어있는 48-웰 플레이트에서 4시간 동안 세포를 배양하였다.
- [0062] 배양된 세포를 수집하고 PE-Cy-결합된 항-CD11c, FITC가 결합된 항-F4/80 및 PerCP가 결합된 항-CD45 항체로 염색한 후 4% 파라포름알데하이드로 15분간 고정시켰다. 상기 세포를 세척하고 PE가 결합된 항-IL-12p75가 포함된 1×BD Perm/WashTM 버퍼로 세포를 30분간 염색하였다.
- [0063] 세포 내 IFN-γ 염색을 위해, 10 mg/ml 브레펠딘 A 존재하에서 50 ng/ml PMA (Sigma) 및 100 µg/ml 이오노마이신(ionomycin; Sigma)으로 세포를 4시간 동안 자극하였다.
- [0064] 그 후, 앞서 언급한 항체 염색과정으로 FITC 결합된 항-CD3, PerCP 결합된 항-CD8 및 항-IFN-γ 항체로 세포를 염색하였다.
- [0065] 1:2 이펙터/타겟 비율을 이용하여 CD107a 이동 분석을 수행하였다.
- [0066] 종양 또는 비장 유래 정제된 CD8⁺ T 세포를 gp70₄₂₃₋₄₃₁ (SPSYVYHQF)가 결합된 CT26 세포와 37℃ 조건에서 5시간 동안 인큐베이션한 후 항-CD8 및 항-CD107a 항체로 염색하였다.
- [0068] <실험예 5> 사이토카인(Cytokine) 분석
- [0069] 사이토카인의 종양 내 수준을 정량하기 위해, Cytokine Bead Array (BD Bioscience)를 이용하여 제조사의 설명서에 따라, 체중 대 부피로 표준화된 종양 용해물을 분석하였다.

- [0071] <실험예 6> qRT-PCR
- [0072] TRIzol (Invitrogen)을 이용하여 세포로부터 전체 RNA를 추출하고 GoScript Reverse Transcription System (Promega)을 이용하여 역전사를 수행하였으며, StepOnePlus Real-Time PCR System(Applied Biosystems)을 이용하여 실시간 정량적 PCR을 수행하였다.
- [0073] 내부대조군인 β -액틴의 발현 수준으로 mRNA의 발현 수준을 표준화하였으며, 하기와 같은 특이적인 프라이머를 사용하였다.
- [0074] iNOS, 5' -CACCTTGAGTTCACCCAGT-3' 및 5' -ACCACTCGTACTTGGGATGC-3' ;
- [0075] CCL5, 5' -CCCTACCATCATCCTCACT-3' 및 5' -CCACTTCTTCTCTGGGTGG-3' ;
- [0076] Cox-2, 5' -AGAAGGAAATGGCTGCAGAA-3' 및 5' -GCTCGGCTTCCAGTATTGAG-3' ;
- [0077] Arg1, 5' -TCACCTGAGCTTTGATGTCG-3' 및 5' -CACCTCCTCTGCTGTCTTCC-3' ;
- [0078] Ym1, 5' -ACTTTGATGGCCTCAACCTG-3' 및 5' -AATGATTCCTGCTCCTGTGG-3' ;
- [0079] IL-10, 5' -CCAAGCCTTATCGGAAATGA-3' 및 5' -TTTTCACAGGGGAGAAATCG-3' ;
- [0080] TGF- β , 5' -TTGCTTCAGCTCCACAGAGA-3' 및 5' -TGGTTGTAGAGGGCAAGGAC-3' ;
- [0081] bact in, 5' -CTAAGGCCAACCGTGAAAAG-3' 및 5' -GGTACGACCAGAGGCATACA-3' .
- [0083] <실시예 1> CD137^{-/-} 및 항-CD137 mAb가 주입된 생쥐에서 침투성 항종양 면역 반응 확인
- [0084] 도 1A와 같이 CD137^{-/-} 생쥐보다 야생형(WT) 생쥐의 종양 성장이 활발하게 진행된 것이 확인됨에 따라, CD137^{-/-} 생쥐의 종양 성장 억제 원인이 되는 매커니즘을 확인하기 위해, CT26 세포접종 후 종양 성장이 가장 활발하게 나타나는 종양 세포 접종 14-16일째에 종양이 형성된 CD137^{-/-} 생쥐에서 침투성 항종양 면역 반응을 분석하였다.
- [0085] 그 결과, 도 1B와 같이 종양이 형성된 CD137^{-/-} 생쥐의 비장에서 활성화된 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포(CD62L^{lo}CD44^{hi})가 높은 백분율로 나타났으며, 도 1C와 같이 CD137^{-/-} 생쥐 비장의 CD8⁺ T 세포는 종양 세포 노출 후 CD107a의 세포 표면 이동에 의해 유의하게 증가된 CTL 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.
- [0086] 상기 결과로부터 CD137^{-/-} 생쥐는 종양 항원에 대한 침투성 면역 반응을 증가시키는 능력을 갖는 것이 확인되었다.
- [0087] 흥미롭게도, 도 1E와 같이 종양 세포 전환 후 5 또는 6 일째에 야생형 생쥐에 항-CD137 단일클론 항체를 지연 투여한 경우, 종양 성장이 명백히 억제되었고, 도 1D와 같이 비장에서 활성화된 표현형을 나타내는 CD8⁺ T 세포의 현저한 증가가 확인되었으며, 도 1F와 같이 CT26 종양 세포에 대한 CD8⁺ T 세포의 CTL 활성의 증가 역시 매우 뚜렷하게 나타났다.
- [0088] 특히, 도 1G와 같이 CD137^{-/-} 생쥐 및 항-CD137 mAb가 주입된 생쥐에서 CD8⁺ T 세포가 결핍된 경우 종양 성장이 완벽하게 회복되었다.
- [0089] 상기 결과로부터 CD137^{-/-} 생쥐 및 항-CD137 mAb가 주입된 생쥐의 증가된 항종양 면역력은 일반적으로 CTL 활성 증가에 의해 유도되는 것이 확인되었다.
- [0091] <실시예 2> CD137^{-/-} 생쥐 및 항-CD137 mAb가 주입된 생쥐에서 종양 내 세포독성 CD8⁺ T 림프구(Tc1s)의 축적에 의한 IL-12 활성 확인
- [0092] CD137^{-/-} 생쥐의 종양에서 종양 특이적 세포독성 T 림프구(CTLs)의 침투 활성화는 종양 항원을 포획하는 항원전

달 제시세포를 활성화시킬 수 있다.

- [0093] CD103⁺ 수지상세포(DCs)는 T 세포 활성화를 위해 종양 항원을 림프구로 운반할 뿐만 아니라, 종양 내 CD8⁺ T 세포를 활성화시킨다.
- [0094] 실제로, 도 2A와 같이 종양 세포 주입 후 9 및 10일째 CD137^{-/-} 생쥐의 종양에서 야생형(WT) 생쥐보다 높은 CD45⁺F4/80⁻MHCII⁺CD11c⁺CD103⁺ DCs 및 IL-12-생산 DCs의 발현이 확인되었으며, 도 2B와 같이 CD137^{-/-} 생쥐 종양에서 M2 대식세포 마커인 CD206를 발현하는 1형 종양 관련 대식세포(TAMs; CD45⁺CD11b⁺Gr-1⁻F4/80⁺)의 현저한 감소가 확인되었다.
- [0095] 유전자 발현 분석 결과, 도 2C와 같이 WT TAMs과 비교하여 CD137^{-/-} 생쥐의 TAMs에서는 Arg1, CD206 및 IL-10 전사인자의 낮은 발현이 나타난 반면, iNOS 및 IL-12 mRNAs의 높은 발현이 확인됨에 따라, CD137^{-/-} 생쥐의 TAMs은 M1형 대식세포인 것을 확인할 수 있었다.
- [0096] 또한, CD137^{-/-} 생쥐의 9 또는 10일째 종양에서 CD103⁺ DCs의 백분율의 증가가 나타났으나, 14일째 종양에서 CD103⁺ DCs의 백분율 증가는 나타나지 않은 반면, M1형 TAMs의 우세가 확인되었다.
- [0097] 항-CD137 mAb 주입한 결과에서도 도 2D 내지 2F와 같이 항-CD137 mAb 주입에 의해 종양 내 CD103⁺ DCs 및 M1형 TAMs 구성이 CD137^{-/-} 생쥐와 거의 동일한 패턴으로 변화된 것이 확인됨에 따라, CD137^{-/-} 생쥐 및 항-CD137이 주입된 생쥐의 종양 미세환경은 자연 또는 치료 유도 면역감시의 주요 특징 중 하나인 종양 내 풍부한 Tc1s 발생에 유리할 것으로 예상하였다.
- [0098] 이를 확인한 결과, 도 3A 및 3D와 같이 CD137^{-/-} 생쥐 및 항-CD137이 주입된 생쥐의 종양에서 IFN- γ 를 생산하는 CD8⁺ T 세포가 높은 백분율로 유지되었으며, 도 3B 및 3E와 같이 WT 생쥐보다 활성화된 표현형을 나타내는 것이 확인되었다.
- [0099] 또한, 도 3C 및 3F와 같이 CD137^{-/-} 생쥐 및 항-CD137이 주입된 생쥐의 종양 내에서 용해성 IFN- γ 가 높은 수준으로 나타났다.
- [0100] 상기 결과들로부터 CD137 결핍 또는 항-CD137 mAb의 주입은 종양 내에 CD103⁺ DCs, M1형 TAMs 및 CD8⁺ T 세포에 의한 IL-12 및 IFN- γ 의 생산 증가를 유도하는 것이 확인되었다.
- [0101] CD103⁺ DCs는 CD8⁺ T 세포에 효과적으로 항원을 제시하고, IL-12는 효과적인 1형 면역 반응을 위해 요구되며, 치료 유도 면역감시의 필수적인 양성 조절자이다.
- [0102] 이러한 IL-12는 CD137^{-/-} 생쥐 및 항-CD137 mAb가 주입된 생쥐의 종양 내에서 DCs 및 TAMs에 의해 발현되고, 이들 생쥐에서 IL-12는 종양 내 CD8⁺ T 림프구(Tc1)를 활성화시킬 것으로 예상하고 이를 확인하였다.
- [0103] 그 결과, 도 4A 및 4E와 같이 CD137^{-/-} 생쥐 및 항-CD137 mAb가 주입된 생쥐에서 IL-12의 생체 내(in vivo) 중화반응은 종양 내 Tc1s를 감소시켰으며, 도 4B 및 4F와 같이 WT 생쥐처럼 종양 성장이 뚜렷하게 회복된 것을 확인할 수 있었다.
- [0104] 흥미롭게도 도 4C, 4D, 4G 및 4H와 같이 CD137^{-/-} 생쥐 및 항-CD137 mAb가 주입된 생쥐에서 IL-12 중화반응 후 종양 내 CD103⁺ DCs 및 M1형 TAMs의 백분율이 회복되는 것이 확인되었다.
- [0106] <실시예 3> CD137^{-/-} 및 항-CD137 mAb가 주입된 생쥐에서 종양 내 CD103⁺ DCs 및 M1형 TAMs의 발생에 따른 IFN- γ 활성 확인
- [0107] 앞선 실험 결과를 통해 IL-12은 CD137^{-/-} 생쥐 및 항-CD137 mAb가 주입된 생쥐의 종양 내 CD103⁺ DCs 및 M1형

TAMs의 분화와 관련있는 것이 확인됨에 따라,

- [0108] Tc1 발생에서 IL-12의 역할을 고려할 때, IFN- γ 는 IL-12의 분화 진행 신호전달에 작용할 것으로 예상하고 이를 확인하였다.
- [0109] 그 결과, CD137^{-/-} 생쥐 및 항-CD137 mAb가 주입된 생쥐에서 IFN- γ 의 중화는 종양 내 Tc1s, CD103⁺ DC 및 M1형 TAMs의 현저한 감소(도 5A-C, E-G)와 종양 성장 억제(도 5D 및 H)를 나타내는 IL-12의 중화 반응과 거의 동일한 변화를 나타내었다.
- [0110] 상기 결과로부터 IL-12 및 IFN- γ 의 종양 내 농도 증가는 CD103⁺ DC / M1형 TAM 및 Tc1의 분화를 상호 촉진함으로써 CD137^{-/-} 생쥐 및 항-CD137 mAb가 주입된 생쥐의 종양 내에서 서로 분비를 유도시키는 것으로 제안될 수 있다.
- [0112] <실시예 4> 종양에서 조절 T 세포의 CD137 발현에 따른 M2형 대식세포 분화 확인
- [0113] CD137^{-/-} 생쥐 및 항-CD137 mAb가 주입된 생쥐는 CD137L 신호가 차단되므로, 종양내 미세환경 변화는 CD137L 신호 결핍 때문일 것으로 예상하고 이를 확인하였다.
- [0114] 그 결과, 도 6A와 같이 CD137 발현 세포는 종양 내의 CD11b⁺ 골수 세포에서 발견되었으며, 도 6B와 같이 CD4⁺Foxp3⁺Treg 세포는 T 세포 중에서 가장 높은 수준의 CD137을 발현하였다. 이와 대조적으로, CD137L 발현은 도 6C와 같이 CD11b⁺Gr-1^{int/null} 골수성 세포에서 주로 발견되었다.
- [0115] 조절 T 세포에서 CD137 발현은 종양 내 CD206⁺M2형 TAMs의 축적이 요구되는지를 확인하기 위해, 종양 세포를 접종하기 전에 CD137^{-/-} 생쥐에 WT 조절 T 세포를 입양세포이식하였다.
- [0116] 그 결과, 도 6D 및 6E와 같이 WT 조절 T 세포의 입양세포이식은 CD137^{-/-} 생쥐의 종양 내 F4/80⁺CD206⁺M2형 TAMs의 축적뿐만 아니라, 종양 성장을 회복시켰다.
- [0117] 상기 결과로부터 조절 T 세포상의 CD137은 골수 세포의 CD137L과 결합하여 종양 내에서 M2형 TAMs로의 분화를 촉진하는 것이 확인되었다.
- [0119] <실시예 5> CD137L 신호의 CD103⁺ DCs 및 M1형 대식세포의 분화 억제효과 확인
- [0120] CD137L 신호가 CD103⁺ DCs의 분화를 억제할 수 있는지 확인하기 위해, Flt3L가 코팅된 대조군 사람 IgG1 또는 CD137-Fc 존재하에서 야생형 생쥐와 CD137^{-/-} 생쥐의 골수 세포를 9일간 배양한 후 IFN- γ 및 GM-CSF를 첨가하고 2일간 추가 배양하여 CD103⁺ 아형의 분화를 유도하였다.
- [0121] 그 결과, 도 7A와 같이 CD137^{-/-} 골수 세포에서는 DC 분화가 매우 활성화되었으며, CD137^{-/-} 골수 세포 유래 DCs (BMDCs)는 CD103⁺ 아형으로 매우 효과적으로 분화된 것이 확인된 반면, 제조합 CD137-Fc 단백질은 야생형 생쥐와 CD137^{-/-} 생쥐의 골수 세포로부터 BMDC 분화 억제가 뚜렷하게 나타났으며, CD103⁺ 아형으로의 분화 능력을 상실한 것을 확인할 수 있었다.
- [0122] 그러나 CD137-Fc는 우선적으로 CD11c^{lo}CD11b⁺ F4/80⁺ 대식세포로 분화되는 편향된 분화방향을 나타내었다.
- [0123] 상기 결과들로부터 CD137L 신호과정은 CD103⁺ DCs의 분화를 차단하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0124] 한편, 종양에서 대식세포는 단핵구 MDSCs로부터 분화된다.
- [0125] 이에 종양이 형성된 생쥐의 비장에서 MDSCs를 분리하여 GM-CSF가 코팅된 대조군 IgG 또는 CD137-Fc의 존재하에서 배양한 결과, 도 7B와 같이 정제된 비장 MDSCs는 Gr-1^{+/int/-}CD11b⁺ 과립구 및 단핵구 골수세포와 혼합되었거나

약간의 F4/80⁺ 대식세포와 혼합된 것을 확인할 수 있었다.

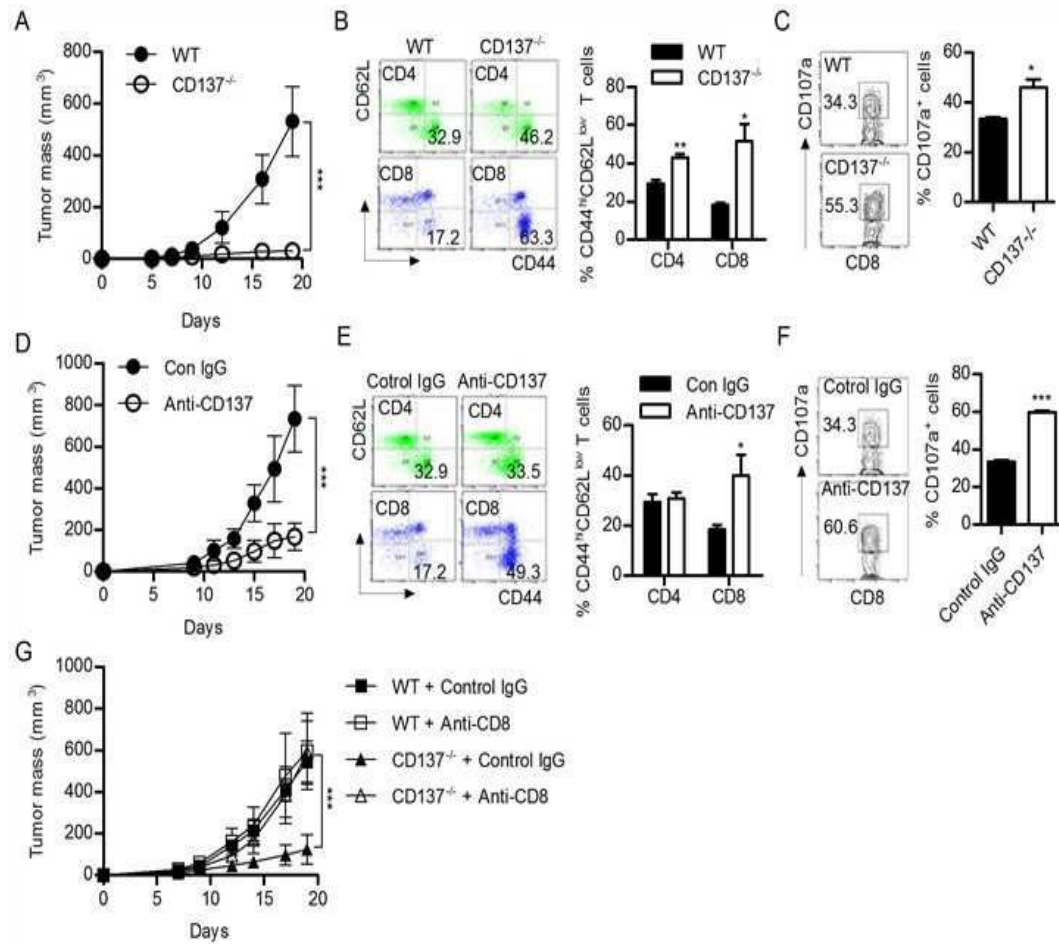
[0126] 상기 중화 배양 조건에서 CD137L의 자극은 도 7D 및 E와 같이 뚜렷한 호중구 분화의 억제를 유도하지만, CD206⁺ M2형 대식세포의 분화를 촉진시킨다.

[0127] mRNA 발현 분석결과, 도 7F와 같이 분화 진행과정과 관련된 Arg-1 및 YM1 mRNA의 발현 증가가 나타났으며, 도 7G 및 H와 같이 CD137^{-/-} 생쥐 및 항-CD137 mAb가 주입된 생쥐의 종양에서 높은 백분율로 호중구가 포함되어 있을 뿐만 아니라 M2형 TAMs가 낮은 비율로 존재하는 것을 확인한 생체 외(in vitro) 결과와 일치하였다.

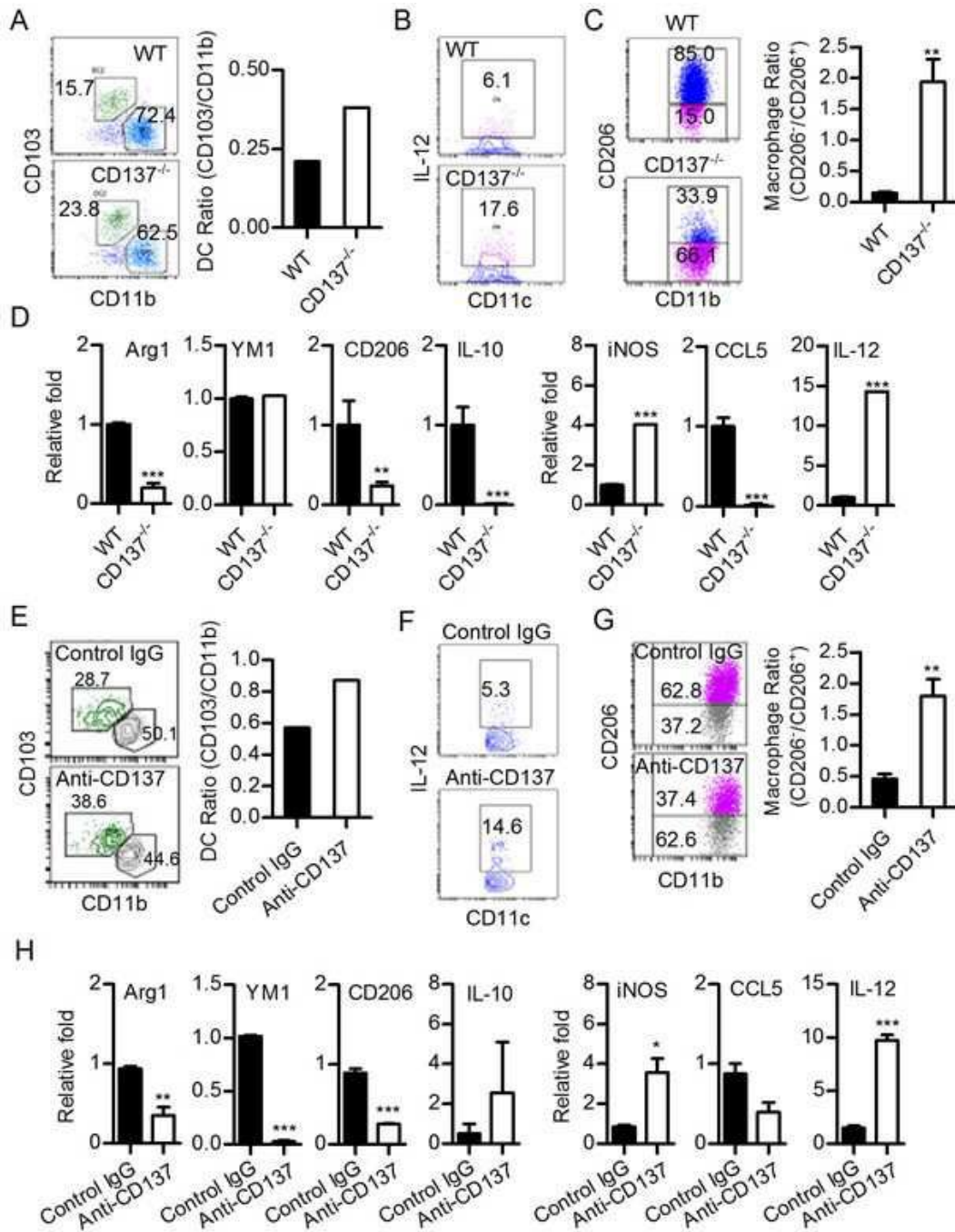
[0129] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

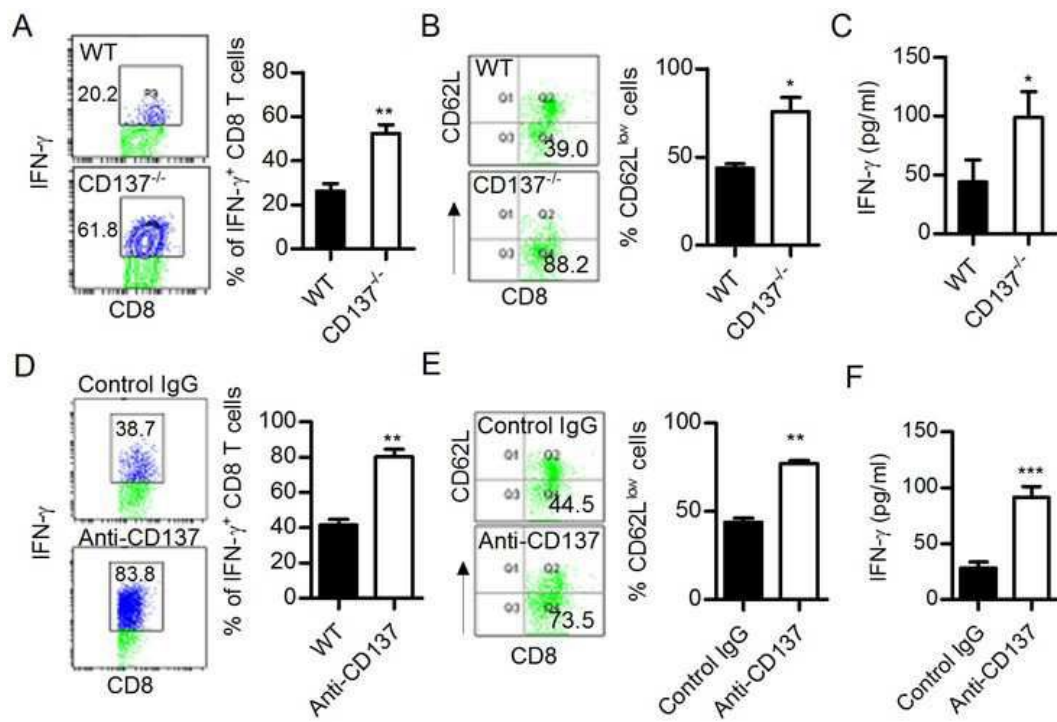
도면1



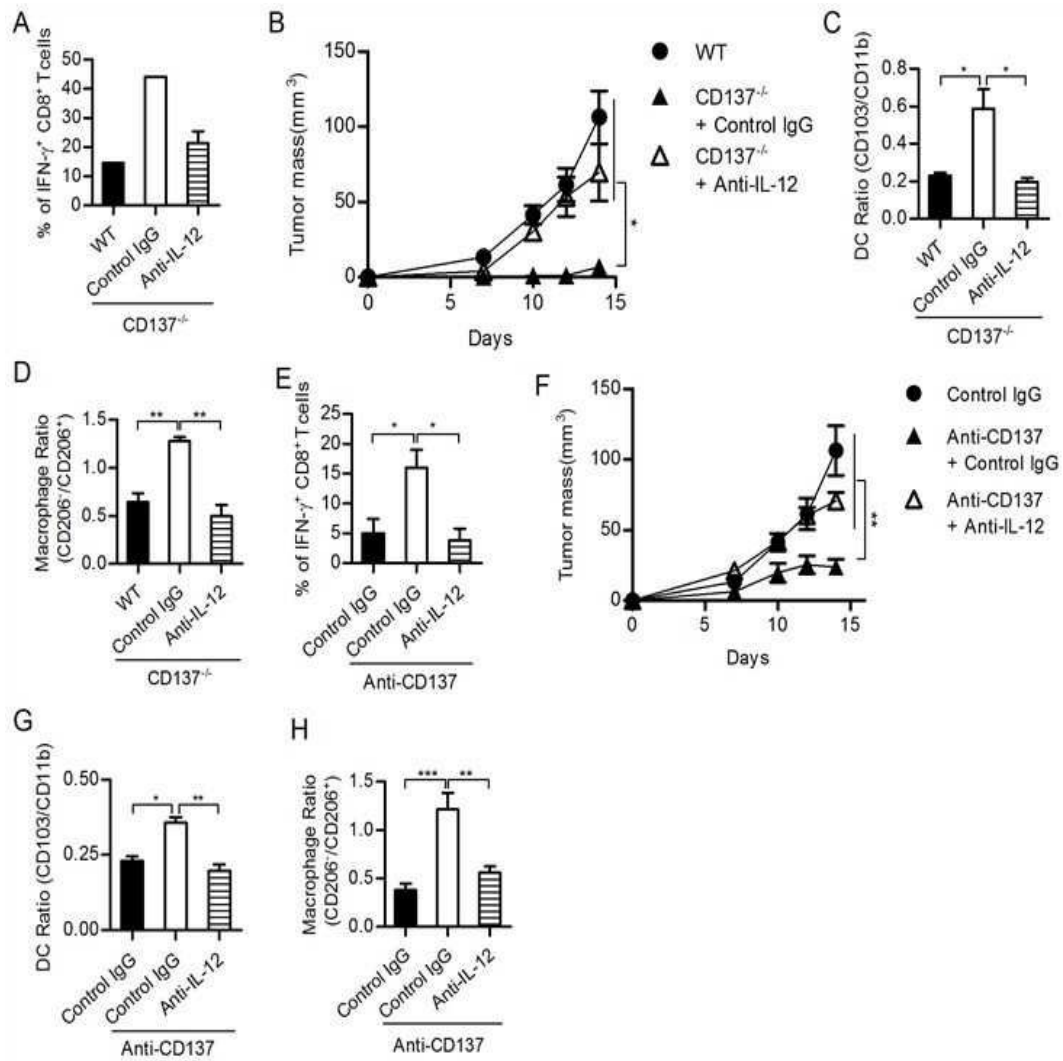
도면2



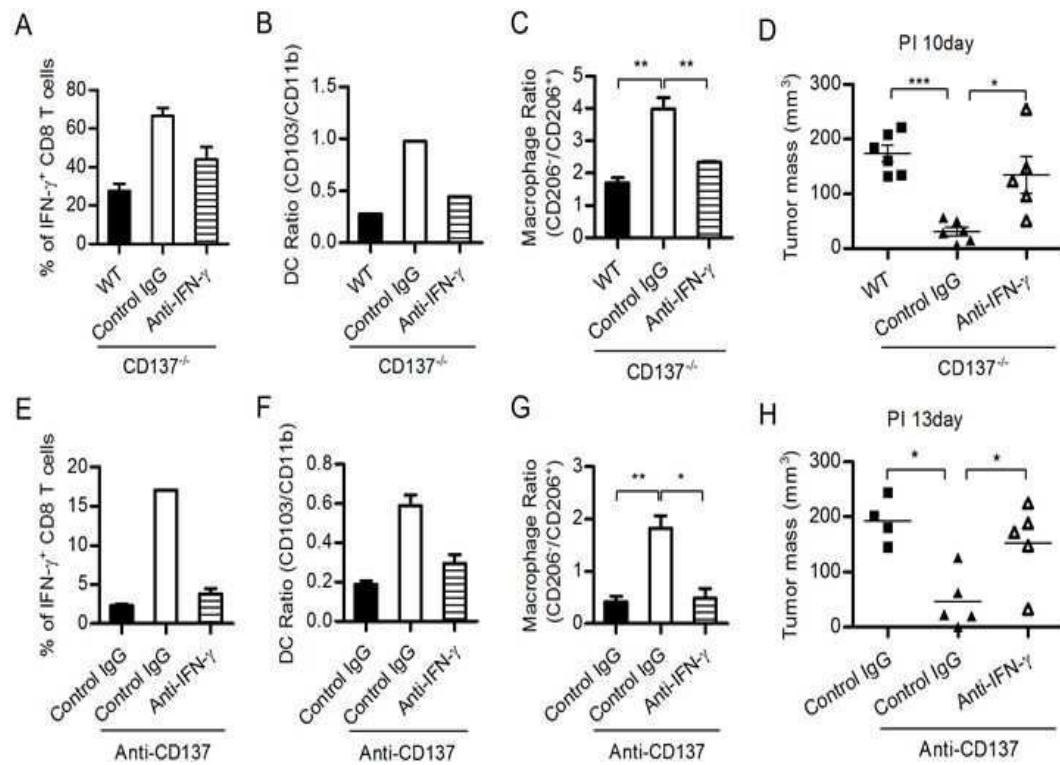
도면3



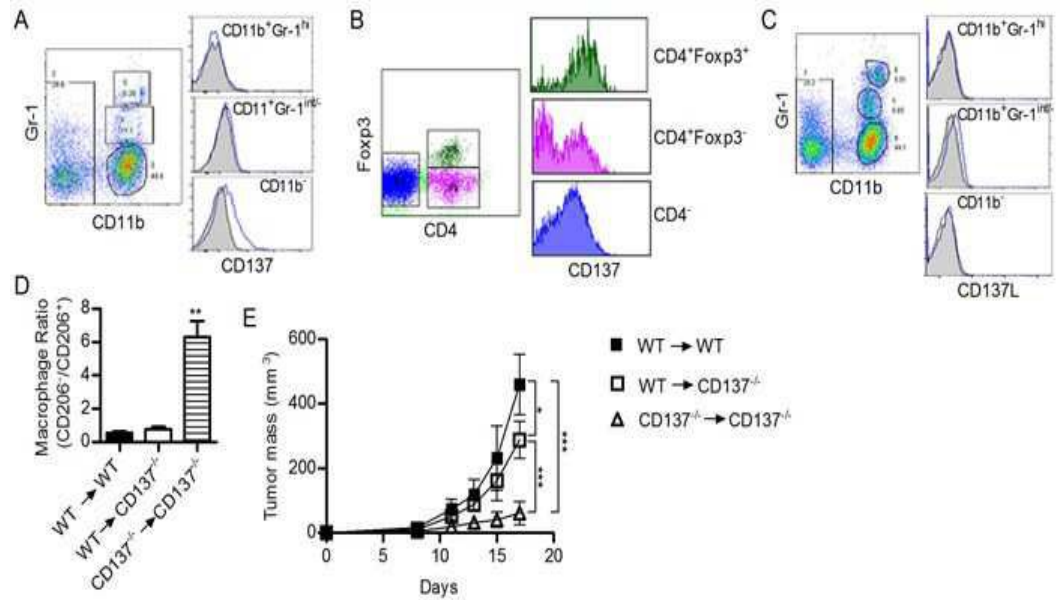
도면4



도면5



도면6



도면7

