



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0127688
(43) 공개일자 2016년11월04일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/519 (2006.01) A61K 31/439 (2006.01)
A61K 9/16 (2006.01) A61K 9/20 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
A61K 31/519 (2013.01)
A61K 31/439 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2016-0051595
(22) 출원일자 2016년04월27일
심사청구일자 2016년04월27일</p> <p>(30) 우선권주장
1020150058796 2015년04월27일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)</p> <p>(72) 발명자
김현식
서울특별시 광진구 광나루로56길 32, 201동 501호
(구의동, 구의현대2단지아파트)</p> <p>(74) 대리인
특허법인태백</p> |
|---|---|

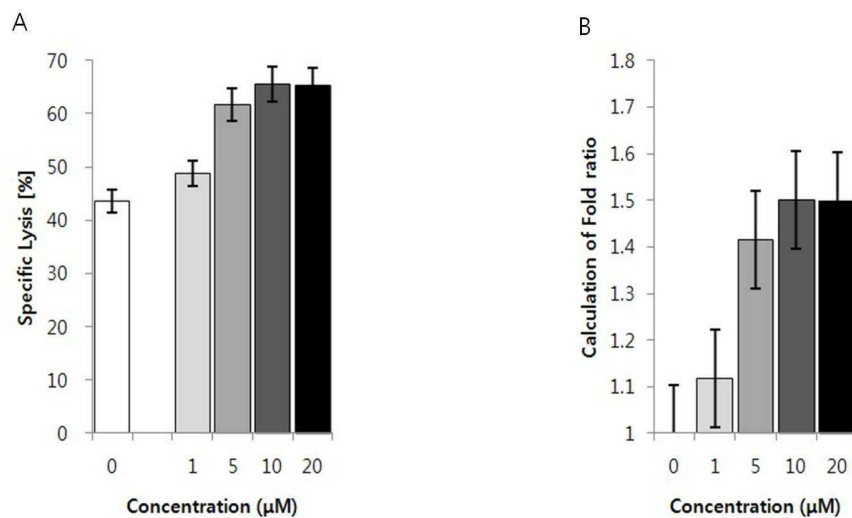
전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 발명의 명칭 자연살해세포 활성화제를 유효성분으로 함유하는 면역증강 및 항암활성증진용 조성물

(57) 요약

본 발명은 MDL-72222 또는 8-아자구아닌을 유효성분으로 함유하는 면역증강 및 항암활성증진용 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따른 MDL-72222 및 8-아자구아닌은 자연살해세포의 탈과립화 및 세포독성을 효과적으로 증가시키는 것이 확인됨에 따라, MDL-72222 또는 8-아자구아닌을 유효성분으로 함유하는 조성물은 자연살해세포를 활성화시켜 면역력을 증가시키는 면역보강제 또는 자연살해세포와 관련된 암질환 및 다양한 면역질환의 치료제로 사용될 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61K 9/16 (2013.01)

A61K 9/20 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

8-아자구아닌(azaguanine)을 유효성분으로 함유하는 면역보강제(adjuvant).

청구항 2

8-아자구아닌(azaguanine)을 유효성분으로 함유하는 면역질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 8-아자구아닌(azaguanine)은 자연살해세포(natural killer cell; NK 세포)의 세포독성 및 탈과립화를 증가시키는 것을 특징으로 하는 면역질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 면역질환은 자가면역질환, 바이러스 감염질환, 이식거부 질환 및 염증질환으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 면역질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 자가면역질환은 다발성 경화증, 루푸스, 류마티스관절염, 크론병 및 1형 당뇨병으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 면역질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 바이러스 감염질환은 후천성면역결핍증, B형 간염, C형 간염, 홍역, 대상포진 및 유두종 바이러스로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 면역질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 염증질환은 천식, 축농증, 아토피, 치주염 및 베체트병으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 면역질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 8

8-아자구아닌(azaguanine)을 유효성분으로 함유하는 자연살해세포 치료 보조제.

청구항 9

8-아자구아닌(azaguanine)을 유효성분으로 함유하는 T 세포 치료 보조제.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 T 세포는 세포독성 T 세포 및 키메라 항원 수용체 T 세포(chimeric antigen receptor T cell)로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 치료 보조제.

청구항 11

MDL-72222를 유효성분으로 함유하는 면역보강제(adjuvant).

청구항 12

MDL-72222를 유효성분으로 함유하는 면역질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 MDL-72222은 자연살해세포(natural killer cell; NK 세포)의 세포독성 및 탈과립화를 증가시키는 것을 특징으로 하는 면역질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 면역질환은 자가면역질환, 바이러스 감염질환, 이식거부 질환 및 염증질환으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 면역질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 15

제12항에 있어서, 상기 자가면역질환은 다발성 경화증, 루푸스, 류마티스관절염, 크론병 및 1형 당뇨병으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 면역질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 16

제12항에 있어서, 상기 바이러스 감염질환은 후천성면역결핍증, B형 간염, C형 간염, 홍역, 대상포진 및 유두종 바이러스로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 면역질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 17

제12항에 있어서, 상기 염증질환은 천식, 축농증, 아토피, 치주염 및 베체트병으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 면역질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 18

MDL-72222를 유효성분으로 함유하는 암질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 MDL-72222는 자연살해세포(natural killer cell; NK 세포)의 세포독성 및 탈과립화를 증가시키는 것을 특징으로 하는 암질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 20

제18항에 있어서, 상기 암질환은 백혈병, 폐암, 간암, 뇌종양 및 췌장암으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 암질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 21

MDL-72222를 유효성분으로 함유하는 자연살해세포 치료 보조제.

청구항 22

MDL-72222를 유효성분으로 함유하는 T 세포 치료 보조제.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 T 세포는 세포독성 T 세포 및 키메라 항원 수용체 T 세포(chimeric antigen receptor T cell)로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 치료 보조제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 자연살해세포 활성 스크리닝 방법을 통하여 선별된 자연살해세포(natural killer cell; NK 세포) 활성화제를 유효성분으로 함유하는 면역증강 및 항암활성증진용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 면역체계를 구성하는 세포들 중, 특히 자연살해세포(natural killer cell; NK 세포)는 항원에 의한 사전 감각 없이도 종양세포, 박테리아, 세포 내 기생생물 또는 바이러스에 감염된 숙주세포를 제거하는 기능을 수행하며,

부적절한 골수 이식을 거부하고, T세포의 면역반응을 조절하는 등 생체 내 면역계 방어 기작의 제 1선에서 작용하는 행동세포이다.

[0003] 이러한 NK 세포의 다양한 기능 중 특히, 암세포를 선택적으로 살상하는 능력이 밝혀지면서 많은 관련 연구들이 진행되었는데, 암 환자의 경우, 말초 혈액의 NK 세포 수나 활성이 정상인보다 감소하였으며, 동물실험에서 NK 세포활성이 저하되면 암 발생 및 암전이 위험이 증가하는 것으로 알려졌다.

[0004] 또한, NK 세포는 숙주에 감염된 병원균 또는 암세포에 대항하기 위한 선천성 면역 반응과 사이토카인 분비를 통한 후천성 면역 반응에 중요한 역할을 하는데, NK 세포가 표적 세포를 살상하는데 사용하는 주된 메커니즘은 퍼포린(perforin) 및 그랜자임(granzyme) B와 같은 세포 용해성 과립을 면역 시냅스를 통하여 표적 세포에 분비하는 것으로, 분비된 퍼포린은 표적 세포벽에 구멍을 만들고, 구멍을 통하여 표적 세포 내로 들어간 그랜자임이 표적 세포의 세포사멸(apoptosis)을 유도한다.

[0005] 이와 같이, NK 세포는 세포가 악성으로 변형되는 발암과정이나, 바이러스 감염 초기의 방어기전에서 결정적인 역할을 하는 것으로 확인되었으며, 이러한 연구들을 바탕으로 암치료 및 면역질환 치료에 있어서, NK 세포를 이용하는 NK 세포 치료법이 대두 됨에 따라, NK 세포의 세포독성능력을 증가시키는 물질의 발굴이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2010-0112302호(2010.10.19)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 자연살해세포의 세포독성을 증가시킬 수 있는 자연살해세포 활성화물질로 선별된 8-아자구아닌 또는 MDL-72222를 유효성분으로 함유하는 조성물을 면역보강제(adjuvant)로 사용하거나 자연살해세포가 관여하는 암 질환 및 면역질환 치료용 약학조성물로 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 8-아자구아닌(azaguanine)을 유효성분으로 함유하는 면역보강제(adjuvant)를 제공하고자 한다.

[0009] 본 발명은 8-아자구아닌(azaguanine)을 유효성분으로 함유하는 면역질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공하고자 한다.

[0010] 본 발명은 8-아자구아닌(azaguanine)을 유효성분으로 함유하는 자연살해세포 치료 보조제를 제공하고자 한다.

[0011] 본 발명은 8-아자구아닌(azaguanine)을 유효성분으로 함유하는 T 세포 치료 보조제를 제공하고자 한다.

[0012] 본 발명은 MDL-72222를 유효성분으로 함유하는 면역보강제(adjuvant)를 제공하고자 한다.

[0013] 본 발명은 MDL-72222를 유효성분으로 함유하는 면역질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공하고자 한다.

[0014] 본 발명은 MDL-72222를 유효성분으로 함유하는 암질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공하고자 한다.

[0015] 본 발명은 MDL-72222를 유효성분으로 함유하는 자연살해세포 치료 보조제를 제공하고자 한다.

[0016] 또한, 본 발명은 MDL-72222를 유효성분으로 함유하는 T 세포 치료 보조제를 제공하고자 한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명에 따르면, 자연살해세포 활성화 스크리닝 방법을 통하여 선별된 8-아자구아닌 또는 MDL-72222는 자연살해세포의 탈과립화 및 세포독성을 효과적으로 증가시키는 것이 확인되었다. 따라서, 본 발명의 8-아자구아닌 또는 MDL-72222를 유효성분으로 함유하는 조성물은 자연살해세포를 활성화시켜 면역력을 증가시키는 면역보강제 또는 자연살해세포와 관련된 암질환 및 다양한 면역질환의 치료제로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0018] 도 1은 MDL-72222가 처리된 NK 세포의 세포독성 활성 증가를 확인한 결과로, 1A는 1, 5, 10 및 20 μ M 농도의 MDL-72222로 활성화된 자연살해세포가 처리된 암 세포군의 세포 용해도를 나타낸 결과이며, 도 1B는 농도별 세포독성 활성 증가 비율을 나타낸 결과이다.
- 도 2는 8-아자구아닌이 처리된 NK 세포의 세포독성 활성 증가를 확인한 결과로, 1A는 1, 5, 10 및 20 μ M 농도의 8-아자구아닌으로 활성화된 자연살해세포가 처리된 암 세포군의 세포 용해도를 나타낸 결과이며, 도 1B는 농도별 세포독성 활성 증가 비율을 나타낸 결과이다.
- 도 3은 MDL-72222 또는 8-아자구아닌이 처리된 암세포의 세포사멸 정도를 확인한 결과이다.
- 도 4는 MDL-72222가 처리된 초대 NK 세포의 탈과립화 활성 증가를 확인한 결과이다.
- 도 5는 8-아자구아닌이 처리된 초대 NK 세포의 탈과립화 활성 증가를 확인한 결과이다.
- 도 6은 1, 5, 10 및 20 μ M 농도의 8-아자구아닌이 처리된 세포치료용 NK 세포의 암세포 살상능력을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 본 발명은 8-아자구아닌(azaguanine)을 유효성분으로 함유하는 면역보강제(adjuvant)를 제공할 수 있다.
- [0020] 또한, 본 발명은 8-아자구아닌(azaguanine)을 유효성분으로 함유하는 면역질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공할 수 있다.
- [0021] 보다 상세하게는, 상기 8-아자구아닌(azaguanine)은 화학식 $C_4H_4N_6O$ 의 구아닌의 아날로그의 일종으로 암세포의 분열 저해 효과가 있는 것이 알려지면서 항암제로 사용되고 있으나, NK 세포 활성화 및 면역질환에 미치는 효과에 대해서는 보고되고 있지 않다.
- [0022] 반면, 본 발명에 따르면, 상기 8-아자구아닌(azaguanine)은 자연살해세포(natural killer cell; NK 세포)의 세포독성 및 탈과립화를 증가시킬 수 있으므로, 이를 면역질환 예방 또는 치료용 약학조성물로 사용할 수 있다.
- [0023] 따라서 본 발명은 8-아자구아닌(azaguanine)을 유효성분으로 함유하는 자연살해세포 치료 보조제를 제공할 수 있다.
- [0024] 또한, 본 발명은 8-아자구아닌(azaguanine)을 유효성분으로 함유하는 T 세포 치료 보조제를 제공할 수 있다.
- [0025] 보다 상세하게 상기 T 세포는 세포독성 T 세포 및 키메라 항원 수용체 T 세포(chimeric antigen receptor T cell; CAR-T)로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0026] 한편, 본 발명은 MDL-72222를 유효성분으로 함유하는 면역보강제(adjuvant)로 제공할 수 있으며, 면역질환 예방 또는 치료용 약학조성물로 제공할 수 있다.
- [0027] 보다 상세하게는, 상기 MDL-72222는 5HT3 수용체 길항 효과를 나타내는 화학식 $C_{15}H_{17}Cl_2NO_2$ 의 화합물로, 베메세트론(Bemesetron)이라는 약물의 주요 성분으로써 구조억제제로 사용되고 있으나, NK 세포 활성화에 미치는 효과에 대해서는 보고되고 있지 않다.
- [0028] 반면, 본 발명에 따른 MDL-72222는 자연살해세포(natural killer cell; NK 세포)의 세포독성 및 탈과립화를 증가시키는 것이 확인됨에 따라, MDL-72222를 면역보강제(adjuvant)나, 면역질환 예방 또는 치료용 약학조성물로 사용할 수 있다.
- [0029] 따라서 본 발명은 MDL-72222를 유효성분으로 함유하는 자연살해세포 치료 보조제를 제공할 수 있다.
- [0030] 또한, 본 발명은 MDL-72222를 유효성분으로 함유하는 T 세포 치료 보조제를 제공할 수 있다. 보다 상세하게 상기 T 세포는 세포독성 T 세포 및 키메라 항원 수용체 T 세포(chimeric antigen receptor T cell; CAR-T)로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0031] 본 발명의 면역질환은 자가면역질환, 바이러스 감염질환, 이식거부 질환 및 염증질환으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0032] 보다 상세하게는 상기 자가면역질환은 다발성 경화증, 루푸스, 류마티스관절염, 크론병 및 1형 당뇨병으로 이루

어진 군에서 선택될 수 있으며, 상기 바이러스 감염질환은 후천성면역결핍증, B형 간염, C형 간염, 홍역, 대상 포진 및 유두종바이러스로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 염증질환은 천식, 축농증, 아토피, 치주염 및 배 체트병으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0033] 본 발명의 면역보강제는 백신들 또는 접종물들에 대한 특이적 면역 반응들을 증진시키는 약제이다. 면역보강제가 백신 또는 접종물 내에 통합된 경우, 일반적으로 특이적으로 그 제조 중의 면역원성 물질들에 대한 특이적 면역반응성을 가속, 연장 또는 그 품질을 증진시키는 작용을 하는, 임의의 물질 또는 제제로서 정의될 수 있다.
- [0034] 본 발명의 면역보강제는 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 MDL-72222 또는 8-아자구아닌(azaguanine)을 포함하는 면역보강제는 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0035] 8-아자구아닌 또는 MDL-72222를 포함하는 면역보강제에 포함될 수 있는 담체, 부형제, 희석제로는 락토즈, 텍스트로스, 슈크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 말티톨, 전분, 글리세린, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 사용할 수 있다.
- [0036] 제제화할 경우에는 보통 사용되는 증진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제할 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 폴리감마글루탐산에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 슈크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등을 사용할 수 있으며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비 경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조제제가 포함된다.
- [0037] 비수용성제제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.
- [0038] 본 발명의 8-아자구아닌 또는 MDL-72222를 포함하는 면역보강제는 투여대상의 나이, 성별, 체중 등에 따라 투여량이 달라질 수 있고, 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서도 백신의 투여량이 증감될 수 있다.
- [0039] 또한, 본 발명은 MDL-72222를 유효성분으로 함유하는 암질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공할 수 있다.
- [0040] 상기 MDL-72222는 자연살해세포(natural killer cell; NK 세포)의 세포독성 및 탈과립화를 증가시켜 암질환을 예방 또는 치료할 수 있다.
- [0041] 본 발명의 암질환은 백혈병, 폐암, 간암, 뇌종양 및 췌장암으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0042] 본 발명의 일실시예에 따르면, MDL-72222 및 8-아자구아닌을 암세포에 직접 처리한 경우, 도 3과 같이 두 물질 모두 암 세포의 사멸이 5% 내외로 확인된 반면, 도 2B와 같이 8-아자구아닌으로 활성화된 자연살해세포가 처리되지 않은 암 세포군과 비교하여 1, 5, 10 및 20 μM 농도의 8-아자구아닌으로 활성화된 자연살해세포가 처리된 암 세포군의 세포독성이 각각 1.12, 1.42, 1.50 및 1.50 배 증가한 것을 확인하였다. 또한, 도 1B와 같이 MDL-72222로 활성화된 자연살해세포가 처리되지 않은 암 세포군과 비교하여 1, 5, 10 및 20 μM 농도의 MDL-72222로 활성화된 자연살해세포가 처리된 암 세포군에서는 세포독성이 각각 1.08, 1.11, 1.21 및 1.21 배 증가된 것을 확인할 수 있었다.
- [0043] 또한, 본 발명의 다른 일실시예에 따르면, 도 4 및 도 5와 같이 MDL-72222와 8-아자구아닌이 처리된 자연살해세포에서 탈과립화가 증가된 것을 확인할 수 있었다.
- [0044] 상기 결과들로부터 MDL-72222 및 8-아자구아닌은 자연살해세포의 탈과립화 및 세포독성 능력을 증가시킬 수 있는 효과적인 자연살해세포 활성제로 사용될 수 있으므로, 8-아자구아닌을 면역보강제, 면역질환 치료제 또는 자연살해세포 치료 보조제로 사용될 수 있으며, MDL-72222를 자연살해세포와 관련된 암질환 및 다양한 면역질환의 치료제로 사용될 수 있다.

- [0045] 또한, 본 발명의 다른 일실시예에 따르면, NK 세포 활성화제 후보물질인 8-아자구아닌이 세포치료용 NK 세포의 암세포 살상능력을 증진시킬 수 있는지 확인하기 위해, 1, 5, 10 및 20 μM 농도의 8-아자구아닌을 세포치료용 NK 세포에 처리하고 8-아자구아닌이 처리된 NK 세포의 암세포 살상능력을 확인한 결과, 도 6과 같이 1, 5, 10 및 20 μM 농도의 8-아자구아닌이 처리된 세포치료용 NK 세포를 투여한 암세포 실험군의 경우, 세포독성이 8-아자구아닌이 처리되지 않은 세포치료용 NK 세포를 투여한 암세포 대조군과 비교하여 각각 1.18, 1.50, 1.50 및 1.73 배 증가하는 것을 확인하였다.
- [0046] 상기 결과로부터 8-아자구아닌은 세포치료용 NK 세포의 세포독성을 효과적으로 증가시키며, 8-아자구아닌에 의해 활성화된 세포치료용 NK 세포는 암세포를 효과적으로 살상하는 것을 확인하였다. NK 세포와 세포독성 T 세포의 암세포 살상기전이 공통됨을 고려할 때 8-아자구아닌은 세포치료용 NK 세포뿐만 아니라 세포치료용 세포독성 T 세포 또는 키메라 항원 수용체 T 세포(chimeric antigen receptor T cell; CAR-T)의 세포독성 증가에도 효과적으로 사용될 수 있다.
- [0047] 따라서, 8-아자구아닌 또는 MDL-72222는 자연살해세포 치료 보조제뿐만 아니라, 세포독성 T 세포와 키메라 항원 수용체 T 세포의 치료 보조제로 사용될 수 있다.
- [0048] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 8-아자구아닌 또는 MDL-72222를 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.
- [0049] 본 발명의 다른 구체예에서, 8-아자구아닌 또는 MDL-72222를 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.
- [0050] 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, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0051] 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.
- [0052] 상기 8-아자구아닌 또는 MDL-72222의 바람직한 투여량은 대상체의 상태 및 체중, 질환의 종류 및 정도, 약물 형태, 투여경로 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.
- [0053] 본 발명에 있어서, 상기 '대상체'는 인간을 포함하는 포유동물일 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.
- [0054] 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.
- [0055] <실시예 1> 세포 배양
- [0056] 사람 NKL(Human nature killer cell line)세포를 미국 Indiana 대학의 M. Robertson에게서 얻었으며, 혈액암세

포주인 721.221 세포를 미국 Stanford 대학의 J.Gumperz와 P.Parham에게서 얻었으며, 혈액암세포주인 K562 세포는 미국ATCC(American Type Culture Collection)에 구입하여 사용하였다. 각 세포를 IL-2(200U/ml, Roche), 10% 태아소혈청(FBS), 1% 페니실린/스트렙토마이신, 1% 소듐 피루브산이 함유된 RPMI 1640 배지 또는 10% FBS, 1% 페니실린/스트렙토마이신이 함유된 IMDM(Iscove's Mod. of DMEM) 배지로 37℃, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 배양하였다. 세포 배양에 필요한 물건 및 시약은 Gibco/BRL, Cellgro/MediaTech, Inc., Nalgene-Nunc International, Sigma-Aldrich Co.에서 구입하여 사용하였다.

[0057] <실시예 2> 자연살해세포(NK 세포) 활성물질 스크리닝

[0058] 1. NK 세포 세포독성(cytotoxicity) 확인

[0059] NK 세포의 표적 세포 살상능력인 세포독성을 Europium 형광물질 분석법을 이용하여 확인하였다.

[0060] 사람 NKL(Human nature killer cell line)세포에 200U/ml 농도의 IL-2를 2일 동안 처리한 후 실험을 진행하였다. 96-웰 플레이트의 한 웰 당 5×10^5 개의 721.221 세포를 분주하고, 형광이 향상된 리간드인 BATDA 시약(Perkin Elmer)을 최종 40 μM 넣고 37℃에서 30분간 반응시킨 후, 5% 태아소혈청이 포함된 IMDM(Iscove's Mod. of DMEM) 배지를 웰 당 100 μl씩 첨가하여 보관하였다.

[0061] 표적 세포에 세포독성을 유도하기에 적합한 NK 세포 수를 확인하기 위해, NK 세포와 721.221 세포를 각각 10:1, 5:1, 2.5:1 및 1.25:1 비율의 세포 수로 혼합하였다. 상기 비율로 NK 세포와 721.221 세포를 혼합한 후, 37℃에서 1시간 30분간 배양하고 원심분리한 후, 상등액을 Eu³⁺ 용액과 반응시켜 형광발현 분석 키트(DELPiA Europium cytotoxicity assay, Perkin Elmer)를 제조사의 권고대로 사용하여 형광발현 정도를 측정하였다.

[0062] 그 결과, 혈액암세포인 721.221 세포주를 40~50% 사멸시키는 5:1 비율이 NK 세포 활성인자 스크리닝에 적합함을 확인하였다.

[0063] 2. 고속대량스크리닝 방법을 이용한 자연살해세포(NK 세포) 활성물질 스크리닝

[0064] 고속대량스크리닝(HTS, High Throughput Screening)방법을 이용하여 저분자 물질 라이브러리인 LOPAC(Sigma, 1280종), PRESTWICK(Prestwick, 1200종)으로부터 NK 세포의 활성을 증가시키는 후보물질을 선별하였다.

[0065] 96-웰 V 바닥 플레이트의 한 웰 당 사람 NKL(Human nature killer cell line)세포를 $2.5 \times 10^4/50\mu\text{l}$ 농도로 분주하고 LOPAC 및 PRESTWICK에 포함되어 있는 화합물을 각각 1 μM 및 5 μM 농도로 37℃에서 1시간 전처리하였다. 전처리를 마친 NKL 세포를 $5 \times 10^3/50\mu\text{l}$ 농도의 721.221 세포와 혼합한 후 37℃에서 1시간 30분간 배양하였다. 배양이 끝난 후 원심분리하여 상층액을 Eu³⁺ 용액과 반응시키고, VICTOR(Perkin Elmer)로 TRF(time resolved fluorescence)형광 발현 정도를 측정하여 NK 세포 활성을 증가시키는 후보 물질을 선별하였다.

[0066] 그 결과, NK 세포의 암세포 살상능력을 증가시키는 물질로 8-아자구아닌(8-azaguanine)과 MDL-72222가 선별되었다.

[0067] <실시예 3> NK 세포의 세포독성 증가 효과 확인

[0068] 1차 스크리닝을 통하여 선별된 NK 세포 활성화제 후보물질인 MDL-72222 및 8-아자구아닌의 NK 세포 특이적인 암세포 살상능력을 확인하기 위해, 각각의 1, 5, 10 및 20 μM 농도로 NK 세포 처리하고 각 물질이 처리된 NK 세포의 암세포 살상능력을 확인하였다.

[0069] 96-웰 플레이트의 한 웰 당 5×10^5 개의 721.221 세포를 분주하고, 형광이 향상된 리간드인 BATDA 시약(Perkin Elmer, 40 μM)을 넣고 37℃에서 30분간 반응시킨 후, 5% 태아소혈청이 포함된 IMDM(Iscove's Mod. of DMEM) 배지를 웰 당 100 μl씩 첨가하여 보관하였다. 각각의 물질을 1, 5, 10 및 20 μM 농도로 NK 세포에 처리하고 BATDA로 표지된 721.221 세포와 5:1의 비율로 혼합하였다. 37℃에서 1시간 30분간 배양하고 원심분리한 후, 상등액을 Eu³⁺ 용액과 반응시켜 형광발현 분석 키트(DELPiA Europium cytotoxicity assay, Perkin Elmer)를 사용하여 형광발현 정도를 측정하였다.

[0070] 그 결과, 도 1과 같이 1, 5, 10 및 20 μM 농도의 MDL-72222이 처리된 NK 세포를 투여한 암세포 실험군의 세포독성이 MDL-72222가 처리되지 않은 NK 세포를 투여한 암세포 대조군과 비교하여 각각 1.08, 1.11, 1.21 및 1.21 배 증가하였으며, 1, 5, 10 및 20 μM 농도의 8-아자구아닌이 처리된 NK 세포를 투여한 암세포 실험군의 경우,

도 3과 같이 세포독성이 8-아자구아닌이 처리되지 않은 NK 세포를 투여한 암세포 대조군과 비교하여 각각 1.12, 1.42, 1.50 및 1.50 배 증가하는 것을 확인하였다.

[0071] 또한, 선별된 MDL-72222 및 8-아자구아닌에 의한 NK 세포 세포독성 증가가 NK 세포에 특이적인 반응인지를 확인하기 위해, 동일한 방법으로 암세포주인 721.221 세포주에 1, 5, 10 및 20 μM 농도의 MDL-72222 및 8-아자구아닌을 각각 단독으로 처리하여 특이적 용해(Specific Lysis) %를 확인하였다.

[0072] 그 결과, 도 3과 같이 MDL-72222 및 8-아자구아닌에 의한 721.221 세포주의 사멸이 5% 내외로 나타나는 것이 확인되었다.

[0073] 상기 결과로부터 MDL-72222 및 8-아자구아닌에 의한 NK 세포 세포독성 증가는 NK 세포에 특이적으로 작용하며, MDL-72222 및 8-아자구아닌에 의해 활성화된 NK 세포는 암세포를 효과적으로 살상하는 것을 확인하였다.

[0074] <실시예 4> 8-아자구아닌 및 MDL-72222에 의한 NK 세포의 탈과립(Degranulation) 증가 확인

[0075] MDL-72222 및 8-아자구아닌에 의한 NK 세포의 활성화 증가 효과를 확인하기 위해, 초대 NK 세포를 이용하여 다음과 같이 세포독성과 밀접한 관련이 있는 탈과립 분석(Degranulation assay)을 수행하였다.

[0076] 정상인으로부터 채취된 말초혈액을 피콜-하이팩(Ficoll-Hypaque)기법을 이용한 비중 원침방법으로 말초혈액 중 단핵세포를 분리하였다. 분리된 단핵세포를 DPBS(Dulbecco's phosphate buffered saline)으로 두 번 세척한 후, 1% 페니실린/스트렙토마이신, 10% 태아소혈청(FBS), 1% 글루타민, 400U/ml IL-2가 첨가된 IMDM(Iscove's Mod. of DMEM)배지를 이용하여 96 웰 둥근 바닥 플레이트에 웰 당 $4 \times 10^5 / 200 \mu\text{l}$ 로 분주하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다.

[0077] 배양된 단핵 세포를 96 웰 V 바닥 플레이트에 웰 당 $2 \times 10^5 / 100 \mu\text{l}$ 로 분주한 후 MDL-72222 및 8-아자구아닌을 각각 1, 5, 10 및 20 μM 농도로 1시간 전처리하였다.

[0078] 전처리 후 단핵세포에 모넨신(monensin), CD107a-FITC 항체 및 NK 세포에 민감한 세포주인 K562를 단핵세포와 동일한 농도로 혼합하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 2시간 동안 배양하였다.

[0079] 배양이 끝난 시료에 항-CD56-PE 및 항-CD3-PerCP 항체를 4°C에서 30분간 처리하였다. 3색 형광으로 염색된 세포를 Accuri C6(BD)로 수집하였고, 데이터 분석은 FlowJo 7.6.5 프로그램을 사용하였다. 림프구 구획은 FSC(forward-scatter), SSC(side-scatter)를 1차 gating으로 정하였다. 그리고 항-CD3-PerCP와 항-CD56-PE를 사용하여 NK 세포(CD56+/CD3-)만을 2차 gating한 후, CD56+ 군에서 CD107a의 NK 세포 표면 발현 정도를 FITC에 대한 형광을 측정하여 NK 세포 탈과립에 대한 양상을 분석하였다.

[0080] 그 결과, 도 4 및 도 5와 표 1과 같이 1 μM 및 5 μM MDL-72222가 처리된 실험군에서 NK 세포의 탈과립 활성이 증가한 것을 확인할 수 있었으며, 8-아자구아닌은 1, 5, 10 및 20 μM 농도에서 NK 세포의 탈과립 활성이 증가한 것을 확인하였다.

표 1

[0081]

	화합물의 농도				
	대조군	1 μM	5 μM	10 μM	20 μM
MDL-72222	18.4	20.8	19.7	18.8	13.3
8-Azaguanine	24.8	25.7	29.3	29.3	29.1

[0082] 상기 결과로부터 MDL-72222 및 8-아자구아닌은 NK 세포의 표적세포 살상 능력 및 세포독성에 관여하는 NK 세포의 탈과립 활성을 증가시키는 것이 확인됨에 따라, MDL-72222 및 8-아자구아닌을 NK 세포가 관여하는 다양한 면역치료제로 사용할 수 있다.

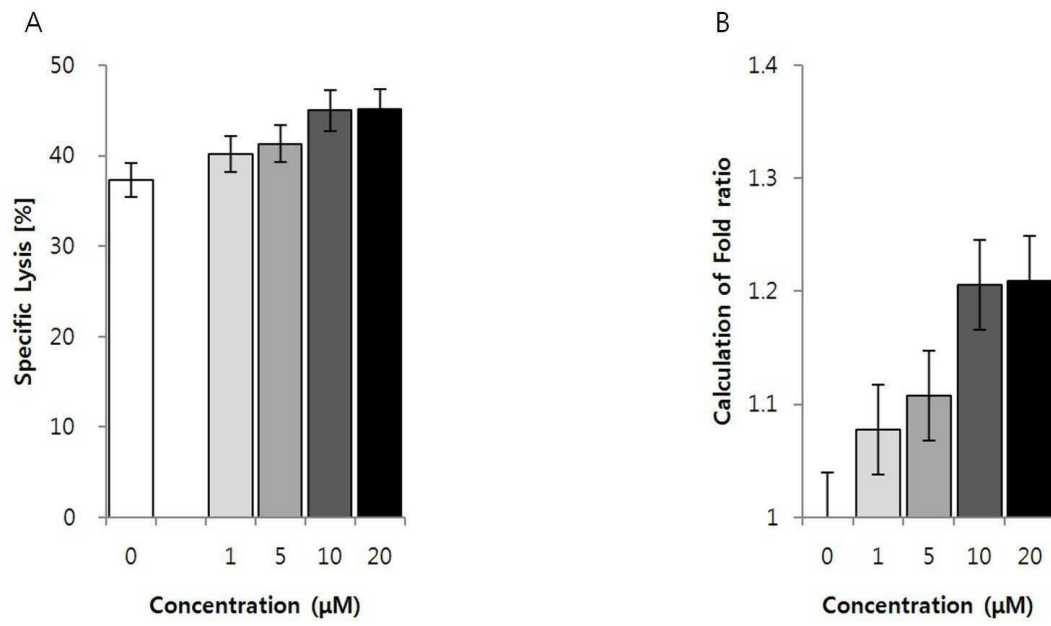
[0083] <실시예 5> 세포치료용 NK 세포의 세포독성 증가 효과 확인

[0084] NK 세포 활성화제 후보물질인 8-아자구아닌이 세포치료용 NK 세포의 암세포 살상능력을 증진시킬 수 있는지 확인하기 위해, 1, 5, 10 및 20 μM 농도의 8-아자구아닌을 세포치료용 NK 세포에 처리하고 8-아자구아닌이 처리된 NK 세포의 암세포 살상능력을 확인하였다.

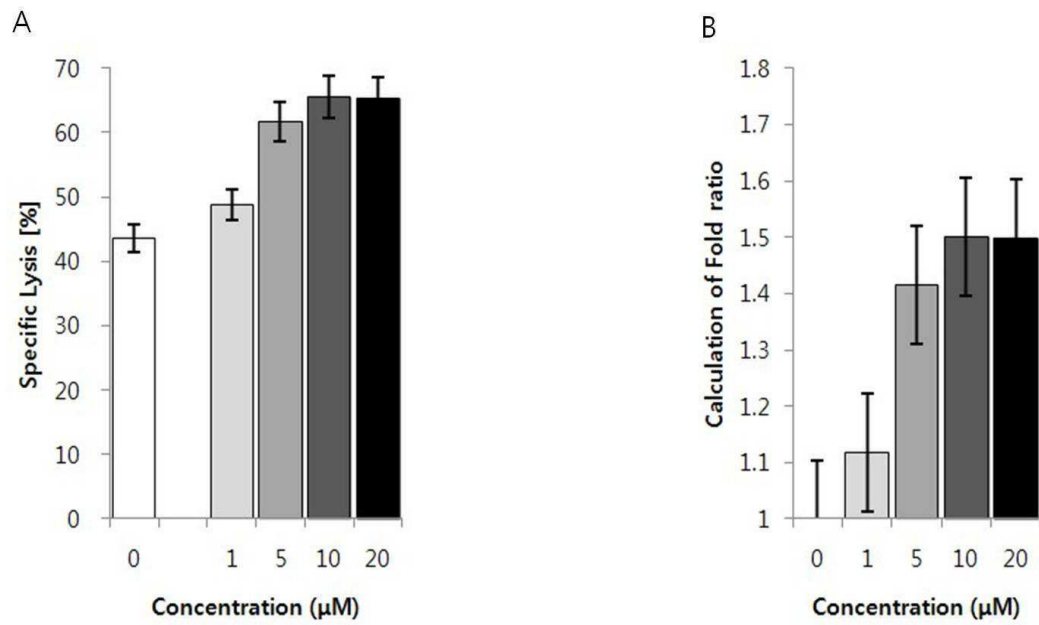
- [0085] NK 세포분리용 StemCell kit를 이용하여 정상인의 단핵세포에서 NK 세포를 순수분리한 후 세포치료용 NK 세포를 제조하였다.
- [0086] 먼저, 분리된 NK 세포를 SCGM(Stem Cell Growth Medium)으로 두 번 세척한 후 100 Gy-irradiated K562-mb-41BBL 영양세포, 100 U/ml IL-2 및 5 ng/ml IL-15가 첨가된 SCGM 배지를 이용하여 24-웰 플레이트에 2×10^6 /ml 이 되도록 분주한 후 2일 간격으로 관찰하여 NK 세포가 웰 당 4×10^6 수준이 되면 새로운 배지를 이용하여 두 웰로 나누고 총 2주 동안 배양한 후, NK 세포를 회수하여 표적 세포인 721.221 세포의 항암활성을 측정하였다.
- [0087] 항암활성 측정을 위해, 96-웰 플레이트의 한 웰 당 5×10^5 개의 721.221 세포를 분주하고, 형광이 향상된 리간드인 BATDA 시약(Perkin Elmer, 40 μ M)을 넣고 37°C에서 30분간 반응시킨 후, 5% 태아소혈청이 포함된 IMDM(Iscove's Mod. of DMEM) 배지를 웰 당 100 μ l씩 첨가하여 보관하였다.
- [0088] 8-아자구아닌을 1, 5, 10 및 20 μ M 농도로 NK 세포에 1시간 전처리하고 BATDA로 표지된 721.221 세포와 1.25:1의 비율로 혼합하고, 37°C에서 1시간 배양한 후 원심분리하였다.
- [0089] 원심분리 후 상등액을 Eu³⁺ 용액과 반응시켜 형광발현 분석 키트(DELPIA Europium cytotoxicity assay, Perkin Elmer)를 사용하여 형광발현 정도를 측정하였다.
- [0090] 그 결과, 도 6과 같이 1, 5, 10 및 20 μ M 농도의 8-아자구아닌이 처리된 세포치료용 NK 세포를 투여한 암세포 실험군의 경우, 세포독성이 8-아자구아닌이 처리되지 않은 세포치료용 NK 세포를 투여한 암세포 대조군과 비교하여 각각 1.18, 1.50, 1.50 및 1.73 배 증가하는 것을 확인하였다.
- [0091] 상기 결과로부터 8-아자구아닌은 세포치료용 NK 세포의 세포독성을 효과적으로 증가시키며 8-아자구아닌에 의해 활성화된 세포치료용 NK 세포는 암세포를 효과적으로 살상하는 것을 확인하였다. NK 세포와 세포독성 T 세포의 암세포 살상기전이 공통되므로, 8-아자구아닌은 세포치료용 NK 세포뿐만 아니라 세포치료용 세포독성 T 세포 및 키메라 항원 수용체 T 세포(chimeric antigen receptor T cell; CAR-T) 세포의 세포독성 증가에도 효과적으로 사용될 수 있다.
- [0092] 한편, 본 발명에 따른 MDL-72222 또는 8-아자구아닌은 목적에 따라 여러 형태로 제제화가 가능하다. 하기에서는 본 발명에 따른 MDL-72222 또는 8-아자구아닌을 활성성분으로 함유시킨 몇몇 제제화 방법을 예시한 것으로 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0093] <제제예 1> 약학조성물의 처방예
- [0094] <제제예 1-1> 주사제의 제조
- [0095] MDL-72222 또는 8-아자구아닌 10 mg, 소듐 메타비설파이트 3.0 mg, 메틸파라벤 0.8 mg, 프로필파라벤 0.1 mg 및 주사용 멸균증류수 적량을 혼합하고 통상의 방법으로 최종 부피가 2 ml이 되도록 제조한 후, 2 ml 용량의 앰플에 충전하고 멸균하여 주사제를 제조하였다.
- [0096] <제제예 2-1> 정제의 제조
- [0097] MDL-72222 또는 8-아자구아닌 10 mg, 유당 100 mg, 전분 100 mg 및 스테아린산 마그네슘 적량을 혼합하고 통상의 정제 제조방법에 따라 타정하여 정제를 제조하였다.
- [0098] <제제예 3-1> 캡슐제의 제조
- [0099] MDL-72222 또는 8-아자구아닌 10 mg, 유당 50 mg, 전분 50 mg, 탈크 2 mg 및 스테아린산 마그네슘 적량을 혼합하고 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.
- [0100] 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

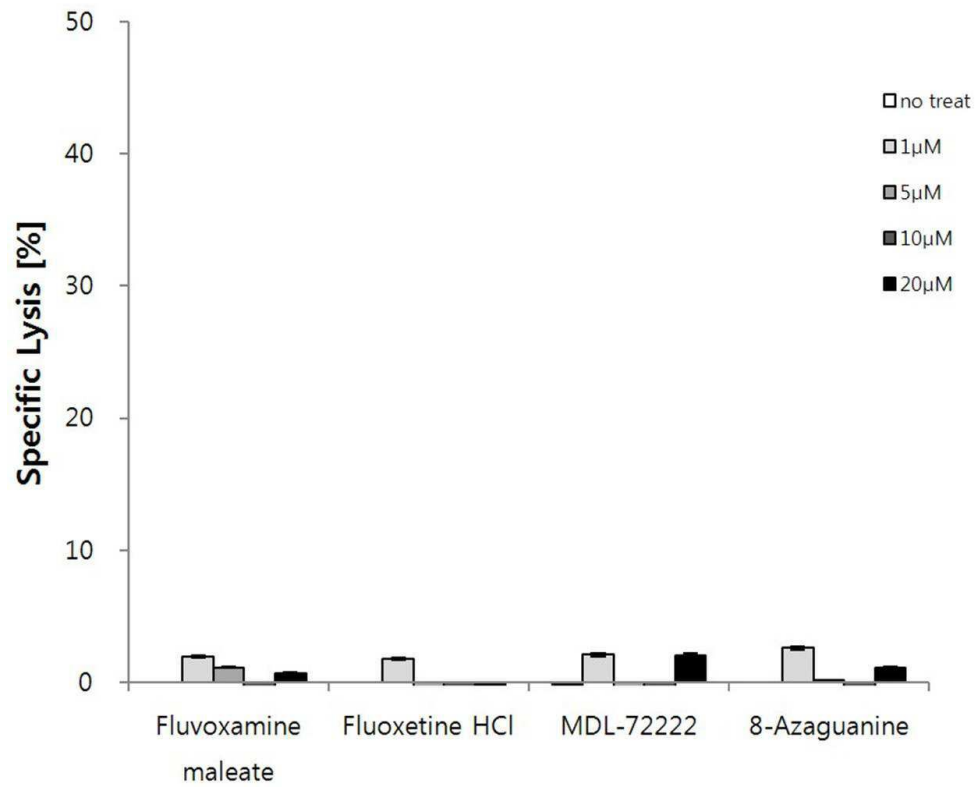
도면1



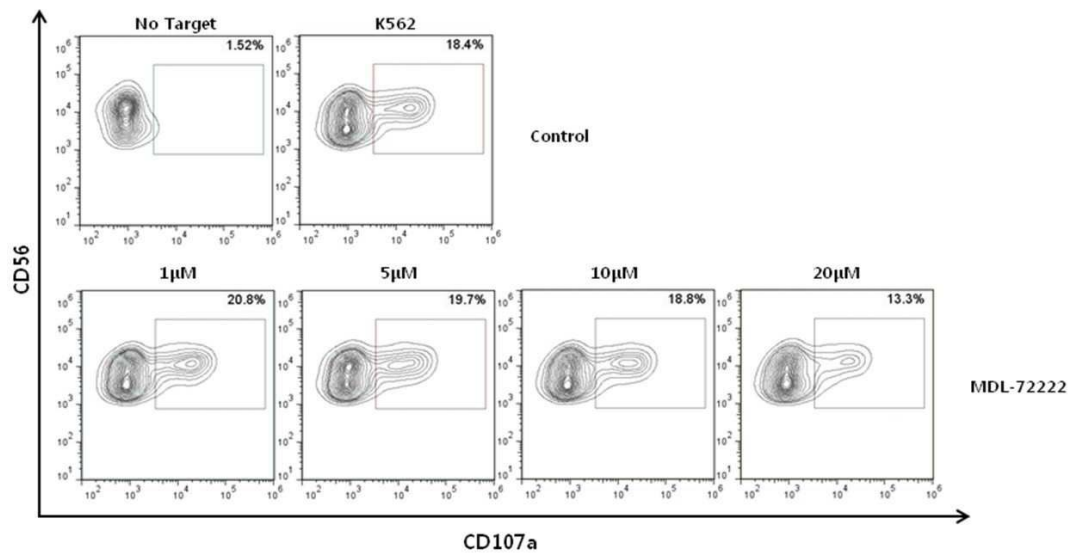
도면2



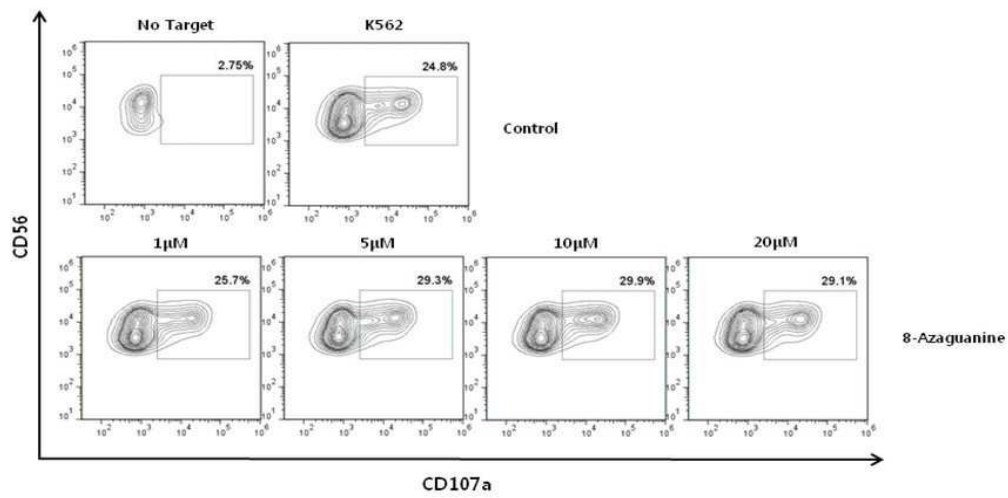
도면3



도면4



도면5



도면6

