



(51) 국제특허분류:

A61K 31/18 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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.

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2021/018197

(22) 국제출원일:

2021 년 12 월 3 일 (03.12.2021)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2020-0170934 2020 년 12 월 9 일 (09.12.2020) KR

(71) 출원인: 서울대학교 산학협력단 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) [KR/KR]; 08826 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR).

(72) 발명자: 이정원 (LEE, Jung Weon); 08826 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR). 김은미 (KIM, Eunmi); 08826 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR). 선현승 (SUN, Hyun-seung); 08826 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR).

(74) 대리인: 이원희 (LEE, Won Hee); 06132 서울시 강남구 테헤란로 147 성지하이츠 2차 8층, 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, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA,

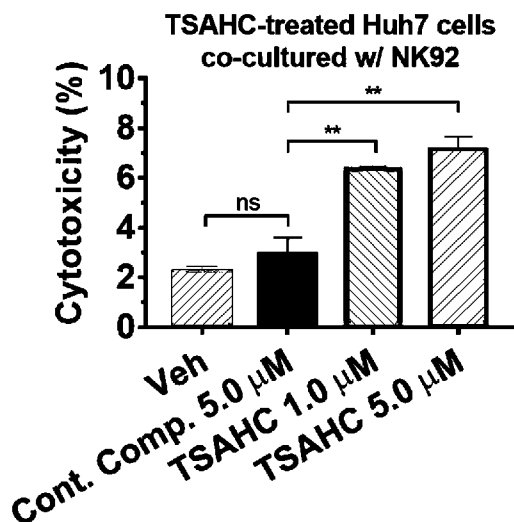
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 청구범위 보정서 및 설명서와 함께 (조약 제19조(1))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: COMPOSITION COMPRISING TSAHC OR PHARMACEUTICALLY ACCEPTABLE SALT THEREOF AS ACTIVE INGREDIENT FOR CONTROLLING ACTIVITY OF NATURAL KILLER CELL

(54) 발명의 명칭: TSAHC 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 자연 살상 세포 활성 조절용 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a composition comprising 4'-(p-toluenesulfonylamino)-4-hydroxychalcone or a pharmaceutically acceptable salt thereof as an active ingredient for controlling activity of immune cells. As treatment with TSAHC was found to increase the population of NK cells in the spleen by inhibiting TM4SF5, increase the expression of an NK cell activation ligand in liver epithelial cells, and ultimately increase the cytotoxicity of NK cells, the composition comprising 4'-(p-toluenesulfonylamino)-4-hydroxychalcone or a pharmaceutically acceptable salt thereof as an active ingredient can be advantageously used as a controller for NK cell activity.

(57) 요약서: 본 발명의 4'-(p-톨루엔설폰아미노)-4-하이드록시칼콘 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 면역세포 활성 조절용 조성물에 관한 것으로, TSAHC 처리에 의해 TM4SF5가 억제되어 비장에 존재하는 NK 세포의 군집이 증가되고, 간상피세포에서의 NK 세포 활성화 리간드의 발현이 증가되며, 궁극적으로 NK 세포의 세포 독성 활성이 증가되는 것을 확인하였는 바, 4'-(p-톨루엔설폰아미노)-4-하이드록시칼콘 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 조성물은 NK 세포 활성 조절제로 유용하게 사용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: TSAHC 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 자연 살상 세포 활성 조절용 조성물 기술분야

- [1] 본 발명은 TSAHC 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 자연 살상 세포 활성 조절용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 간은 우리 몸에서 지질 등의 대사 작용, 해독, 담즙의 배설, 각종 영양소의 저장, 조혈이나 혈액응고 및 순환 혈액량의 조절 등 많은 기능을 한다. 따라서, 간에 장애가 발생하면 여러 가지 기능이 저하되고, 최악의 경우에는 생명의 유지가 곤란해진다.
- [3] 간의 기능을 보다 구체적으로 살펴보면, 첫째, 에너지 대사를 관리하는 기능이 있어 음식물로부터 흡수된 탄수화물, 지방, 및 아미노산을 포함하는 단백질 등의 모든 영양소들이 간에서 에너지를 생산할 수 있는 물질로 대사되어 전신에 공급되거나 저장된다. 둘째, 간에 존재하는 약 2,000여 종의 효소, 알부민, 응고인자들이 혈청 단백질, 담즙산, 인지질, 콜레스테롤 등의 지방을 합성하고 저장 및 분배한다. 셋째, 해독 및 분해 기능으로서, 간에서 약물, 술, 독성물질 등을 해독시키므로 이 과정에서 간세포가 손상되기 쉽다. 따라서, 약물, 독 또는 알코올에 의한 간질환이 흔히 발생할 수 있다. 넷째, 간은 각종 대사산물을 십이지장으로 배설하는 기능을 하며 면역기능 등이 있어 생명 유지에 중요한 역할을 한다.
- [4] 간질환은 원인에 따라 바이러스성 간질환, 알코올성 간질환, 약물 독성 간질환, 지방간, 자가면역성 간질환, 대사성 간질환 및 기타로 구분할 수 있다. 간질환은 초기 자각증상이 없어 상당히 진행된 뒤에서야 발견되기 때문에 우리나라뿐만 아니라 세계적으로 사망원인의 수위를 차지하고 있다. 이에, 간질환을 효과적으로 진단하거나 치료하는 방법에 관한 연구가 필요하다.
- [5] 인간의 간(liver)에 염증이 생기는 현상은 여러 만성적 간 질환의 병인이면서 특성이라고 할 수 있다. 알코올, 바이러스 감염, 독소 축적 및 대사 기능(metabolism) 이상으로 인한 간상피세포의 만성적 손상과 세포의 사멸에 기인하여 동반되는 염증 반응은 추가적인 간질환의 유발 및 심화에 중요한 작용을 한다. 이러한 간질환의 발병 및 심화과정에서도 염증반응의 과잉이 병인으로서 작용하기도 하지만, 그 간질환의 심화에 따른 치료를 위한 방편으로 간절제술 및 간이식을 시도할 경우, 과다염증반응이 문제가 생길 수 있어 면역억제의 필요성이 생긴다.
- [6] 정상 간에서 만성적 간 세포 자극/손상 및 대사 기능의 이상으로 인한 비알콜성지방간은 세포의 손상과 사멸로 인한 염증이 동반되어 지방간염으로

심화되고, 나아가 세포외기질(extracellular matrix)의 축적과 세포의 이상 증식을 초래하는 섬유화 및 간경화 증상으로 심화될 수 있다. 간에 존재하는 상피세포 혹은 간성상세포와, 대식세포, T세포 및 NK(자연살상세포) 세포를 포함하는 면역세포 간의 상호작용에 따른 대사-염증 환경의 변화 및 상호작용에 따라 섬유화/경화된 간 조직이 암화(carcinogenesis)되는 것이 억제되거나 촉진될 수 있다.

- [7] TM4SF5(Transmembrane 4 L six family member 5)는 세포막을 4번 통과하는 테트라스판닌(tetraspanin)으로서 만성적 간상피세포의 손상에 따른 다양한 사이토카인 및 케모카인의 작용으로 간상피세포 및 대식세포에서 발현이 높아지는 것이 확인되었다. 따라서, 간상피세포와 대식세포의 상호작용은 TM4SF5의 발현에 의존하여 간의 염증 반응 및 면역 환경을 재구성(remodeling)하여 지방간염을 넘어서 간 섬유화 또는 간 경화를 유발할 수 있다. 궁극적으로 암화가 이루어질 즈음에는 상피세포의 TM4SF5 발현이, 대식세포, T세포 및 NK 세포 등을 포함하는 면역세포의 항암 활성 기능을 억제할 수 있도록 하는 면역회피(immune escape)의 과정을 가능하도록 하여 효과적인 암화내지는 암발병률을 높일 수 있다.
- [8] 따라서, TM4SF5의 발현을 억제하거나 TM4SF5의 기능을 조절하는 억제제로써 소분자화합물 또는 항체를 이용한다면, 간 조직에서 간상피세포와 면역세포 간의 상호작용을 조절 억제하여 지방간염, 섬유화/경화로의 심화를 억제 조절할 수 있을 것이고, 또한 궁극적으로 NK 세포 또는 T세포들 등을 포함하는 세포의 항암 면역 활성을 회피하고자 하는 기능을 제거할 수 있음으로써 간암에 대한 면역 치료의 수단이 생길 수 있을 것으로 예상된다.
- [9] 이에, 본 발명자들은 간조직에서 간상피세포와 면역세포 간의 상호작용을 억제하여 지방간염, 섬유화 또는 경화를 억제 조절하고, 궁극적으로 NK 세포의 항암 면역 활성을 회피하고자 하는 기능을 제거하기 위한 TM4SF5 억제제에 대하여 연구하던 중, TM4SF5 발현에 의해 비장 혹은 간에 존재하는 NK 세포 혹은 CD4⁺ 양성 보조 T세포의 군집이 감소하고, TSAHC 처리에 의해 TM4SF5의 활성이 억제되어 비장 혹은 간에 존재하는 NK 세포의 군집이 증가되고, NK 세포 활성화 리간드의 발현이 증가되며, 궁극적으로 NK 세포의 세포 독성 활성이 증가되는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [10] 본 발명은 NK 세포의 살상 효과를 높여주기 위해, 4'-(p-톨루엔설폰아미노)-4-하이드록시칼콘 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 자연 살상 세포 활성 조절용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결 수단

- [11] 상기 목적을 달성하기 위하여,
 [12] 본 발명은 4'-(p-톨루엔설폰아미노)-4-하이드록시칼콘 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 자연 살상 세포 활성화 조절용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [13] 본 발명의 4'-(p-톨루엔설폰아미노)-4-하이드록시칼콘 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 자연 살상 세포 활성화 조절용 조성물에 관한 것으로, TSAHC 처리에 의해 TM4SF5가 억제되어 비장 혹은 간에 존재하는 NK 세포의 군집이 증가되고, NK 세포 활성화 리간드의 발현이 증가되며, 궁극적으로 NK 세포의 세포 독성 활성이 증가되는 것을 확인하였는 바, 4'-(p-톨루엔설폰아미노)-4-하이드록시칼콘 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 조성물은 NK 세포 활성화 조절제로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [14] 도 1은 디에틸니트로사민(diethylnitrosamine, DEN)처리에 따른 간의 손상 및 간암 마우스 모델의 간조직을 H&E 염색하여 간의 손상 및 면역세포 밀집(염증) 정도를 확인한 도이다.
- [15] 도 2는 간의 손상 및 간암 마우스 모델에서 시간에 따른 생존율을 측정한 도이다.
- [16] 도 3은 간의 손상 및 간암 마우스 모델의 간조직을 이용하여 라미닌(Laminin), STAT3(signal transducer and activator of transcription 3), TM4SF5의 발현수준, STAT3 Tyr705의 인산화(pY⁷⁰⁵STAT3) 및 ERK1/2의 인산화(p-Erk)을 웨스턴블롯(western blot)을 통해 확인한 도이다.
- [17] 도 4는 간의 손상 및 간암 마우스 모델에서 TM4SF5, STAT3, pY⁷⁰⁵STAT3 (STAT3 Tyr705의 인산화), 콜라젠, 라미닌 및 라미닌 γ 2의 발현 정도를 H&E 및 immunohistochemistry를 통해 확인한 도이다.
- [18] 도 5는 간의 손상 및 간암 마우스 모델을 확보하기 위한 DEN $\pm$ TSAHC 약물처리 등을 개략적으로 나타낸 도이다.
- [19] 도 6은 대조군 및 처리군 동물의 간의 손상 및 간암 마우스 모델에서 종양 형성 정도를 확인한 도이다.
- [20] 도 7은 간의 손상 및 간암 마우스 모델에서 지름이 1.0 mm 이상인 종양의 숫자(a) 및 총 부피(b), 각 동물에서 최대 종양의 크기(c)를 분석한 도이다.
- [21] 도 8은 간의 손상 및 간암 마우스 모델의 간조직에서 종양을 관찰하기 위하여 H&E 염색, 세포증식을 나타내는 핵단백질 Ki67 및 간암 마커인 α -feto protein(AFP)의 발현을 위한 DAB(3,3'-diaminobenzidine) immunohistochemistry를 수행한 결과를 나타낸 도이다.
- [22] 도 9는 간의 손상 및 간암 마우스 모델에서 각 마우스의 간/체중 비율(a), 혈장

- 내 ALT(b), 총 콜레스테롤(c) 및 혈장 글루코스(d) 양을 확인한 도이다.
- [23] 도 10은 간의 손상 및 간암 마우스 모델의 간조직을 AFP(α -fetoprotein) 염색과 더불어 면역세포들이 밀집된 육아종염증(granulomatous inflammation) 형성 정도를 확인한 도이다.
- [24] 도 11은 대조군 및 처리군 동물의 간의 손상 및 간암 마우스 모델에서 각 마우스의 비장을 확보하여 면역염색후 유세포분석을 통하여(a), 보조 T세포(b), 세포 독성 T세포(c) 및 자연살상세포 NK 세포(d)의 군집을 확인한 도이다.
- [25] 도 12는 간의 손상 및 간암 마우스 모델에서 각 마우스의 간조직을 확보하여 면역염색후 유세포분석을 통하여(a), 보조 T세포(b), 세포 독성 T세포(c) 및 NK 세포(d)의 군집을 확인한 도이다.
- [26] 도 13는 간의 손상 및 간암 마우스 모델에서 각 마우스의 간조직을 확보하여 NK 세포로부터 분비되는 싸이토카인(a, b) 및 과립(c)들의 생성 정도를 면역염색 및 유세포분석을 통하여 확인한 도이다.
- [27] 도 14는 렌티바이러스를 이용하여 non-specific shRNA(NS) 및 shTM4SF5(#2 및 #4 sequence)를 Huh7 간상피세포에 감염시켜 만든 target 세포에서 TM4SF5 발현을 확인하고(a), 그 target 세포 및 Effector 세포인 NK92 세포의 배양 비율에 따른, NK92 세포의 세포 독성(cytotoxicity) 정도를 확인(b)한 도이다.
- [28] 도 15는 렌티바이러스를 이용하여 non-specific shRNA(NS) 및 shTM4SF5(#2 및 #4 sequence)를 간상피세포인 Huh7(a), Hep3B(b) 및 HepG2(c)에 감염시킨 후, 각 세포에서 NK 세포의 세포 독성 활성화와 관련된 여러 리간드(ligand) 막단백질의 mRNA 발현 정도를 확인한 도이다.
- [29] 도 16은 렌티바이러스를 이용하여 non-specific shRNA(NS) 및 shTM4SF5(#2 및 #4 sequence)를 간상피세포에 감염시킨 후, 간상피세포와 NK92 세포와의 공동배양 후, NK92 세포에서 NK 세포의 세포 독성 활성화와 관련된 여러 수용체(receptor) 막단백질의 mRNA(a) 및 살상 관련 싸이토카인 혹은 과립(b)들의 발현 정도를 확인한 도이다.
- [30] 도 17은 Gene Expression Omnibus (GEO) database (accession numbers GSE14520)로부터 'Analyze with GEO2R'를 이용하여 정상간 조직과 간암 조직에서의 TM4SF5, SLAMF7(Signaling lymphocytic activation molecule F7), MICA(MHC Class I Polypeptide-Related Sequence A) 및 ULBP1(UL16 Binding Protein 1) 및 ULBP2(UL16 Binding Protein 2)의 mRNA 발현 수준을 확인한 도이다.
- [31] 도 18은 렌티바이러스를 이용하여 non-specific shRNA(NS) 및 shTM4SF5(#2 및 #4 sequence)를 HepG2 간상피세포에 감염시켜 만든 Target 세포 및 Effector 세포인 NK92 세포의 공동배양 비율에 따른, Target 세포에서의 TM4SF5 발현(a) 및 NK92 세포의 세포 독성 정도(b)를 확인한 도이다.
- [32] 도 19는 렌티바이러스를 이용하여 non-specific shRNA(NS) 및 shTM4SF5(#2 및 #4 sequence)를 HepG2 간상피세포에 감염시켜 만든 Target 세포 및 Effector

세포인 NK92 세포의 공동배양 비율에 따른, NK 세포의 ERK1/2의 인산화 정도를 확인한 도이다.

- [33] 도 20은 TSAHC 처리 농도에 따른 NK92 세포와 공동배양된 Huh7 간상피세포의 세포 사멸 정도를 확인한 도이다.
- [34] 도 21은 렌티바이러스를 이용하여 non-specific shRNA(NS), shTM4SF5(#2 및 #4 sequence) 또는 공벡터(EV)를 Huh7 간상피세포 또는 SNU449 세포에 감염시킨 후, 각 세포에서 NK 세포의 세포 독성 활성화와 관련된 여러 리간드 막단백질의 발현 정도를 확인한 도이다.
- [35] 도 22는 SNU449 세포에 대조 발현 벡터 (EV) 혹은 TM4SF5 벡터를 발현(TM4SF5)하는 레트로바이러스로 감염시킨 세포들에 TSAHC를 처리하지 않거나 (0), 0.5, 1.0, 또는 2.0 μ M로 24 시간 동안 처리한 후, 세포추출액을 확보하여 SLAMF6((Signaling lymphocytic activation molecule F6), SLAMF7 및 MICA/B(MHC Class I Polypeptide-Related Sequence A/B) 단백질들의 발현을 확인한 도이다.
- [36] 도 23은 SNU449 세포에 EV(대조군 벡터) 혹은 TM4SF5 벡터를 발현(TM4SF5)하는 레트로바이러스로 감염시키거나(a), TM4SF5의 발현을 억제한 Huh7-KO 세포주에 다시 EV(대조군 벡터) 혹은 TM4SF5 벡터를 주입하여 얻은 세포주(b)의 세포추출액을 확보하여 NK92 세포를 활성화시킬 수 있는 막단백질 리간드의 발현을 확인한 도이다.
- [37] 도 24는 인간 NK세포주인 NK92 세포에 EV(대조군 벡터) 혹은 TM4SF5 벡터를 발현(TM4SF5)하는 레트로바이러스로 감염시킨 세포들(왼쪽) 혹은 TM4SF5를 발현을 억제한 Huh7-KO 세포주에 EV 혹은 TM4SF5 벡터를 주입하여 얻은 세포들(오른쪽)로부터, 세포추출액을 확보하여 NK92 세포를 활성화를 억제할 수 있는 막단백질 PD-1(programmed cell death protein-1) 수용체와 PDL-1(Programmed Death Ligand 1) 수용체(a)와 리간드(b)의 발현을 확인한 도이다.
- [38] 도 25는 TM4SF5를 발현을 억제한 Huh7-KO 세포주에 EV 혹은 TM4SF5 벡터를 주입하여 얻은 세포 (a) 혹은 인간 NK 세포주인 NK92 세포에 EV 혹은 TM4SF5 벡터를 발현(TM4SF5)하는 레트로바이러스로 감염시킨 세포들(b)를 이용하여 qRT-PCR을 수행하여 NK세포의 세포독성과 관련된 각 유전자들의 mRNA 수준을 확인한 도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

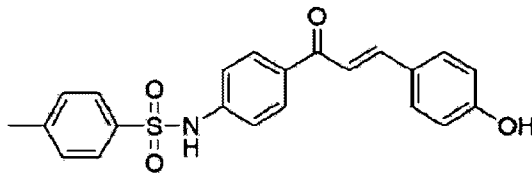
- [39] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [40] 본 발명은 4'-(p-톨루엔설폰아미노)-4-하이드록시칼콘 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 자연 살상 세포(Natural killer cell, NK cell) 활성 조절용 조성물을 제공한다.
- [41] 본 명세서에서 사용된 용어,

"4'-(p-톨루엔설포닐아미노)-4-하이드록시칼콘[4'-(p-toluenesulfonylamido-4-hydroxychalcone)]"은 칼콘계 화합물로 합성을 통해 제조된 것일 수 있다. 상기 4'-(p-톨루엔설포닐아미노)-4-하이드록시칼콘은 TSAHC으로 사용될 수 있으며, 녹는점은 106 ~ 107°C이고, $^1\text{H NMR}$ (300 MHz; MeOD) δ 2.25 (3H, s), 6.82 (2H, d, $J = 86$ Hz), 7.23 (4H, m), 7.42 (1H, d, $J = 155$ Hz), 7.51 (2H, d, $J = 86$ Hz), 7.66 (1H, d, $J = 155$ Hz), 7.73 (2H, d, $J = 83$ Hz), 7.90 (2H, dd, $J_1 = 87$, $J_2 = 20$ Hz) 및 HERIMS m/z 3931035 $[\text{M}^+]$ (calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{NO}_4\text{S}$, 3931034)의 특징을 가지는 화합물이다.

[42] 상기 4'-(p-톨루엔설포닐아미노)-4-하이드록시칼콘은 하기 화학식 1의 구조를 가진다.

[43] [화학식 1]

[44]



[45] 본 명세서에서 사용된 용어, "TM4SF5(transmembrane 4 L6 family member 5) 단백질"이란, 세포막을 4번 통과하는 막수용체 그룹인 테트라스패닌, 테트라스판 또는 TM4SF(transmembrane 4 super family)에 포함되는 단백질로서, 세포막을 4번 통과하는 서로 유사한 구조로 이루어진다. 상기 TM4SF5 단백질은 생화학적으로 막횡단영역(transmembrane domain)으로 추정되는 4개의 소수성 부위를 포함하는 구조를 공유하고 있다.

[46] 상기 4'-(p-톨루엔설포닐아미노)-4-하이드록시칼콘 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 간의 손상, 면역세포의 밀집 또는 염증을 억제할 수 있다.

[47] 상기 4'-(p-톨루엔설포닐아미노)-4-하이드록시칼콘 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 간조직에서의 면역세포의 밀집 정도, Ki67 또는 AFP 단백질의 발현 정도 및 육아종염증의 형성 정도를 감소시킬 수 있다.

[48] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들이 TSAHC 처리가 간의 손상 정도 및 염증 반응에 미치는 영향을 확인하기 위하여, PBS를 처리하는 대조군과 디에틸나이트로사민 처리를 통한 간 조직의 손상을 위한 동물 모델 그룹들의 간 손상 정도를 확인한 결과, DEN 처리군의 간 조직에서는 PBS를 처리한 대조군에 비하여 간의 손상 정도와 면역세포의 밀집이 두드러졌으며, TSAHC를 동시에 또는 차순으로 처리한 DEN+TSAHC1 및 DEN+TSAHC2 군의 경우, DEN 처리군에 비하여 간의 손상 및 면역세포의 밀집 또는 염증 정도가 감소하였음을 확인하였다(도 1 참조).

[49] 또한, 상기 4'-(p-톨루엔설포닐아미노)-4-하이드록시칼콘 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 간조직에서의 TM4SF5 또는 라미닌(Laminin)의 발현을 억제하거나, STAT3의 Tyrosine 705 또는 ERK1/2의 인산화의 증가를 억제할 수 있다.

- [50] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들이 실험예 1-1의 마우스의 간조직을 이용하여, TM4SF5, STAT3, STAT3 Tyr705의 인산화, ERK1/2의 인산화 및 라미닌의 발현 정도를 웨스턴블랏을 통해 확인한 결과, PBS를 처리한 대조군에 대비하여 DEN 처리군에서 대식세포 및 NK 등 면역세포의 특성인 pY705-STAT3, p-Erk 및 라미닌의 발현이 TM4SF5 발현 향상과 더불어 높았으며, DEN+TSAHC1 군에서의 TM4SF5의 발현 수준은 DEN 처리군과 큰 차이가 없었으나, pY705-STAT3 및 라미닌의 발현이 낮아졌으며 DEN+TSAHC2 군에서는 pY705-STAT3의 수준이 DEN 처리군보다 낮아진 것을 확인하였다(도 3 참조). 또한, H&E 및 immunohistochemistry를 수행한 결과, PBS 처리군과 대비하여 DEN 처리군에서는 간의 손상이 증가하였고, TM4SF5, Tyr705가 인산화된 STAT3, 콜라젠, 라미닌 및 라미닌 $\gamma 2$ 의 발현이 향상되었으나, 이러한 DEN에 의한 효과는 TSAHC를 처리함에 따라 감소함을 확인하였다(도 4 참조).
- [51] 또한, 상기 4'-(p-톨루엔설폰아미노)-4-하이드록시칼콘 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 간에서 종양의 형성, 종양의 숫자 및/또는 종양의 부피 및 최대 종양의 크기를 감소시킬 수 있다.
- [52] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 간 손상 및 간암 발병 상관성 확인하기 위하여 간의 손상 및 간암 마우스 모델에서 DEN을 처리한 WT 마우스에서는 크고 작은 종양들이 많이 생성되었으나, TSAHC를 동시에 처리한 그룹에서는 종양이 훨씬 작고 적게 생기는 것을 확인하였다(도 6 참조). 또한, 밀접하게도 종양의 숫자 및 총 부피, 각 동물에서 최대 종양의 크기도 DEN을 처리한 WT 마우스에 비해 TSAHC를 동시에 처리한 그룹에서 감소하는 경향이 있음을 확인하였다(도 7a 내지 7c 참조).
- [53] 또한, 상기 4'-(p-톨루엔설폰아미노)-4-하이드록시칼콘 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 분리된 시료 내 ALT, 콜레스테롤 또는 글루코스 수치를 낮출 수 있다.
- [54] 상기 분리된 시료는 혈액, 전혈, 혈청 및 혈장으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있고, 바람직하게는 상기 분리된 시료는 혈청일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [55] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 간암 발병과 대사 기능 조절 사이의 연관성을 확인하기 위해 간의 손상 및 간암 마우스 모델의 혈청을 분리하여 ALT, 콜레스테롤 및 글루코스의 양을 측정하였고, DEN 처리 때문에 간의 손상 및 암이 생길 경우에, 간/체중의 비율, ALT 간수치, 혈액 속에 콜레스테롤 및 glucose의 수준이 높아지고, KO 마우스 혹은 TSAHC 처리 때문에 TM4SF5의 기능이 억제되어 암이 적게 생긴 그룹에서는 그들의 값들이 낮게 확인하였는데(도 9a 내지 9d 참조), 이는 간암발병과 TM4SF5 및 염증-대사 기능과의 상관성이 있음을 나타낸다.
- [56] 또한, 면역세포 침투와 종양 형성 사이의 상관성 확인한 결과, WT+DEN+TSAHC 군은 AFP의 염색 정도와 육아종염증(granulomatous

inflammation)의 정도가 동반하여 높았으나, TSAHC 처리에 따라 그 염색들의 정도가 낮아져, 면역세포들이 침투가 억제되는 것과 염증 및 종양 형성이 둔화된 것이 서로 상호관계가 있음을 확인할 수 있었다 (도 10 참조).

- [57] 또한, 상기 4'-(p-톨루엔설폰아미노)-4-하이드록시칼콘 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 비장 내 자연 살상 세포의 군집을 증가시킬 수 있다.
- [58] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 TSAHC 처리 여부에 따른 비장 내 면역세포 군집의 상태를 확인하기 위해, 2주령의 C57BL/6 정상 WT 마우스 및 Tm4sf5^{-/-} KO 마우스 수컷에 vehicle을 처리하거나(Age-matched 대조군), DEN(25 mg/kg 체중)을 1회 IP 주사하고, 1주일에 2회씩 DMSO(40% DMSO) 혹은 TSAHC(5 mg/kg 체중/40% DMSO) IP 주사하여 처리하였다. 45주가 지난 후, 비장 및 간에서의 T세포 및 NK 세포 등의 면역세포들을 실시예 6에 기재된 면역염색법과 유세포분석법을 통하여 면역세포들을 조사하였다. 그 결과, 간암이 크고 많이 생긴 WT+DEN 군의 경우, 보조 T세포의 군집은 감소하였으므로 보조 T세포의 감소로 종양이 생겼을 것이고, 세포독성 T세포의 경우는 오히려 군집이 증가하여, 상기 세포독성 T세포가 간 손상 및 암 발병에 유의적으로 기여하지 않음을 확인하였다(도 11a 내지 11d 참조). 그러나, NK 세포의 경우, WT+DEN 군은 대조군과 대비하여 NK 세포의 군집이 감소하였다. 또한, DEN 처리하였으나 유전자 Tm4sf5가 낙아웃(KO)된 KO+DEN 군이나 TSAHC 처리에 따라 TM4SF5 단백질 활성이 억제된 실험군은 NK 세포의 군집이 증가하였다. 이는, TM4SF5-의존적 DEN 처리에 따른 간의 손상 및 암 발병은 비장에 존재하는 NK 세포의 군집과 유의적인 연관성이 있음을 시사한다.
- [59] 또한, 상기 4'-(p-톨루엔설폰아미노)-4-하이드록시칼콘 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 표적 세포에서 MICA, MICB, CADM1(cell adhesion molecule 1), SLAMF6, SLAMF7, ULBP1, ULBP2, ULBP3, Nectin-1(CD111) 및 Nectin-2(CD112)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 발현을 증가시킬 수 있다.
- [60] 상기 표적 세포는 손상된 간 세포 또는 간암세포일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [61] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들이 간암세포와 NK92 세포를 공동배양을 한 후에, NK92 세포주에서의 활성화를 위한 수용체 막단백질들의 mRNA 수준을 qRT-PCR로 확인한 결과, (target 세포의 MICA 및 MICB와 결합하는) NK92 세포의 NKG2D, (target 세포의 SLAMFs와 결합하는) SLAMF6 및 SLAMF7의 mRNA 발현이 TM4SF5가 발현이 유지된 세포보다 발현이 억제된 간암세포(target 세포)와 공동배양되었을 때 NK92 세포에서 더 높아짐을 확인하였다(도 16a 및 16b 참조).
- [62] 또한, TM4SF5를 발현하는 Huh7 세포주에 대조 shRNA(NS)를 주입하여 발현 억제를 하지 않거나 shTM4SF5(#2 혹은 #4 서열 표적)를 주입하여 억제된 세포들로부터(왼쪽), SNU449 세포에 대조 발현 벡터(SNU449Cp) 또는 TM4SF5

백터를 발현(SNU449Tp 혹은 SNU449T7)하는 렌티바이러스로 감염시킨 세포들로부터 세포추출액을 확보하여 웨스턴블랏을 수행한 결과, TM4SF5가 발현하는 세포들의 경우에서 (NK92 세포를 활성화시킬 수 있는) 막단백질 리간드(SLAMF7 및 MICA/B 등)가 감소하였다(도 21 참조).

- [63] 또한, 상기 4'-(p-톨루엔설폰아미노)-4-하이드록시칼콘 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 PRF1(Perforin-1), GZMB(Granzyme B), CD107a(Cluster of Differentiation 107a, 혹은 lysosomal-associated membrane protein 1, LAMP1), TNF- α (Tumor necrosis factor- α), FasL(Fas ligand) 및 TRAIL(TNF-related apoptosis-inducing ligand)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 발현을 증가시킬 수 있다.
- [64] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들이 간암세포와 NK92 세포의 공동배양을 한 후에, NK92 세포주에서의 활성화 정도를 NK92 세포가 분비하는 사이토카인 및 과립(granule)들을 qRT-PCR로 분석한 결과, PRF1, GZMB, CD107a, TNF- α , FasL, 및 TRAIL의 mRNA들이, TM4SF5가 발현이 높은 세포보다 발현이 억제된 간암세포(target 세포)와 공동배양되었을 때, NK92 세포에서 더 높아짐을 확인하였다(도 16a 및 16b 참조).
- [65] 또한, 상기 4'-(p-톨루엔설폰아미노)-4-하이드록시칼콘 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 간상피세포에서 CD112 (Nectin-2), CD111 (Nectin-1), PD-L1의 발현을 억제시키고, 자연 살상 세포에서 CD112R(CD112 receptor), TIGIT(T Cell Immunoreceptor With Ig And ITIM Domains), CD96(Cluster of Differentiation 96) 및 PD-1(programmed cell death protein-1)의 발현을 억제시킬 수 있다.
- [66] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 TM4SF5를 발현하는 간상피세포 (Huh7)에서 막단백질 리간드인 CD112, CD111, PD-L1이 증가하고, NK세포에서 수용체인 CD112R, TIGIT, CD96 및 PD-1이 각각 증가하는 것을 확인하였다 (도 24a 내지 도 25b 참조).
- [67] 이하, 본 발명을 다음 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 이들에 의해 제한되는 것은 아니다.

발명의 실시를 위한 형태

[68] <실시예 1> 세포의 배양

- [69] 마우스 정상세포인 AML12, 인간 간암 세포 중 TM4SF5를 발현하지 않는 SNU449 세포주에 TM4SF5를 발현하는 레트로바이러스(retrovirus)를 감염시켜 만든 세포주(SNU449Tp 및 SNU449T7)와 대조군 바이러스(control virus)를 감염시킨 SNU449Cp 세포주, TM4SF5를 원래 내인성으로(endogenous) 발현(Hep3B, HepG2, Huh7)하는 세포, 인간 배아 신장 세포주(HEK293과 HEK293T, KCLB, 대한민국, HEK293FT, Thermo, 미국)는 10%의 FBS와 항생제(Invitrogen, CA, 미국)가 포함된 DMEM 혹은 RPMI-1640 배양액(WelGene,

대구 대한민국)으로 37°C 5% CO₂ 세포 배양기에서 배양하였다. 일차 간세포(Primary hepatocytes)는 C57BL/6 정상 WT 혹은 Tm4sf5^{-/-} KO 마우스에서 분리하여 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's medium) 혹은 RPMI-1640(Roswell Park Memorial Institute Medium, Hyclone)에 10% FBS(GenDEPOT), 1% penicillin/streptomycin(GenDEPOT), 그리고 1 x GlutaMax(Invitrogen, 미국)를 첨가하여 위와 같은 방법으로 배양하였다. 인간 자연 살상 세포(natural killer cell, NK cell) NK92 세포주는 재배합 인간 IL-2(Peprotech) 200.0 U/ml, 12.5% FBS 및 12.5% fetal horse serum(GenDEPOT)가 포함된 α -MEM(Invitrogen) 배양액을 사용하여 배양하였다.

[70] <실시예 2> 유전자 주입 및 발현 억제

[71] 공벡터(Empty vector, EV) 혹은 포유동물 발현 플라스미드(expression plasmids)에 포함된 cDNA를 세포주에 lipofectamine 3000(Thermo Fisher Scientific Inc.)을 이용하여 형질감염(transfection)시키거나, 공벡터나 cDNA를 포함하는 렌티바이러스 벡터를 숙주세포에 감염시켜 얻은 렌티바이러스를 감염시켜, 연구대상 세포주에 유전자를 인위적으로 발현하도록 하였다. 한편, siRNA 및 pLKO.1-shRNA(control 서열 혹은 표적하는 유전자의 특정서열을 표적하는 서열)을 48시간 동안 Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent(Thermo Fisher Scientific Inc.)를 이용하여 형질감염 시키거나 렌티바이러스를 감염시켰다.

[72] <실시예 3> TM4SF5 발현 억제 및 유도

[73] 간상피세포에서 TM4SF5의 발현을 억제하기 위하여 pLKO.1-shRNA(control 서열, TM4SF5 #2 혹은 #4 서열)를 48시간동안 형질감염 시키거나 렌티바이러스를 감염시켰다. 인간 TM4SF5 유전자에 여러 tag를 위한 유전자가 연결된 발현 벡터를 제작(Cell Metabolism 2019, Vol 29: 1306-1319)하여 형질감염하거나 TM4SF5-표적 레트로바이러스 또는 렌티바이러스를 확보하여 감염시켰다. TM4SF5 유전자를 발현 억제를 위한 shRNA 서열을 하기 표 1과 같다.

[74] [표1]

Name	Sequence (5'-3')	서열 번호
Human Tm4sf5, #2, Sense	CCGGACCATGTGTACGGGAAATGTGCCTCGAGGCACATTT TCCCGTACACATGGTTTTTG	1
Human Tm4sf5, #2, Anti-sense	AATTCAAAAACCATGTGTACGGGAAATGTGCCTCGAGGC ACATTTTCCCGTACACATGGT	2
Human Tm4sf5, #4, Sense	CGGCCATCTCAGCTTGCAAGTCCTCGAGGACTTGCAAGCTG AGATGGTTTTTG	3
Human Tm4sf5, #4, Anti-sense	AATTCAAAAACCATCTCAGCTTGCAAGTCCTCGAGGACTTG CAAGCTGAGATGG	4

[75] <실시예 4> TM4SF5 유전자가 녹아웃(Knock Out, KO)된 마우스 제작

- [76] C57BL/6 마우스를 이용하여 cas9/RGEN KO 마우스를 제작하였다. RGEN site[마우스 Tm4sf5 Exon 1 표적을 위한 sgRNA 서열 (5'-3'): sgRNA1 GAGGTTGCCGTCCGTCCAGGTGG(서열번호 5), sgRNA2 GCTGAGGTTGCCGTCCGTCCAGG(서열번호 6) 그리고 Tm4sf5 Exon 3 표적을 위한 서열: RG1-GCGGGAGCTGGGCTCCGAATTGG(서열번호 7), RG2-TTAAGCATTTGGGTCCAATTCGG(서열번호 8), RG3-TGAGAAATCCTGTTTGATCTTGG (서열번호 9), RG4-AGGTATTAGGGGTGGCCTATGGG(서열번호 10)]을 이용하여 여러 가지 bp(29, 240, 502, 510, 522 및 538bp)가 결실(deletion)된 마우스를 얻었다. Mouse TM4SF5 프라이머[Forward- GTAGTATGCGGGAGGCACTG (서열번호 11), Reverse- GGGTGACCACTCAGACTTCC(서열번호 12)]를 이용하여 T7E1 assay를 통해 WT/mutant PCR 생산물 간의 heteroduplex formation을 관찰하여 돌연변이 마우스(mutant mouse)를 찾고, 정확하게 KO된 마우스를 실험에 사용하였다. 마우스 TM4SF5의 extracellular loop 2가 시작되는 아미노산 36번 트레오닌(Threonine)이 존재하는 Exon 1을 포함하는 29bp가 결실되어 있는 (Tm4sf5 Exon1^{-/-}) 마우스는 mouse-*Tm4sf5* 유전자를 위한 프라이머[forward 5'-CCAAGCCTCCCACCTGTGA-3' (서열번호 13), reverse 5'-GCTCCAGCATTCTCACCATC-3'(서열번호 14)]이용한 PCR 방법으로 유전형을 확인을 수행하였다.
- [77] <실시예 5> 간의 손상 및 간암 마우스 모델 제조
- [78] 2주령의 동물에 디에틸나이트로사민(Diethylnitrosamin, DEN)을 처리하여 간의 손상 및 간암 모델을 유발하는 경우에는, 50 mg/kg의 DEN(Sigma-Aldrich)은 28주 혹은 45주동안 1주일에 1회 복강 내 주사(Intraperitoneal injection, IP injection)하였다. DEN을 각각 처리하면서 TSAHC(40% DMSO/60% PBS에 용해)를 같이 처리한 실험에서는 위와 동일하되 TSAHC를 50 mg/kg 일주일에 2-3번을 복강 내 주입하였다. DEN를 28주동안 처리한 경우에는, 동시에 함께 처리하거나(DEN+TSAHC1), DEN을 처리하고 나서 10주가 지난 다음부터 함께 처리한(DEN+TSAHC2) 방법으로 두 가지 프로토콜로 나누었다.
- [79] 2주령의 수컷 정상 WT 혹은 Tm4sf5^{-/-} KO 마우스에 DEN(25 mg/kg 체중)을 1회 복강에 주사하였다. TSAHC 처리군은 5 mg/kg 체중(40% DMSO)의 농도로 1주일에 2회씩 IP 주사하였다. 45주가 지난 후, 동물을 희생시켜 간조직의 손상 및 암 발병 정도를 확인하였다.
- [80] <실시예 6> 동물로부터 면역세포 분리 및 유세포분석
- [81] 마우스 비장세포 분리는 경추 탈골법으로 희생시킨 후 마우스의 비장을 무균적으로 적출하여 RPMI 1640 배양액으로 씻은 후 멸균 유리봉을 이용하여 분쇄하여 세포를 유리시켰다. 분리된 세포 현탁액을 70 μ m nylon mesh(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)에 통과시켜 배양액으로 2번 세척하고, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리과정을 거친 후 이것을 Tris-buffered ammonium

chloride(NH_4Cl , pH 7.2)와 증류수에 현탁시켜 5분간 처리하여 적혈구를 제거하였다.

- [82] 마우스 간조직을 확보하여 100 μm nylon mesh를 통하여 물리적 분쇄를 통하여 세포 현탁액을 얻었다. 면역세포들은 37.5% percoll(GE Healthcare) 농도구배 원심분리를 통해 확보하였다. 적혈구(Erythrocyte)는 RBC lysis buffer(Invitrogen)를 이용하여 용해시켰다. 면역세포 종류에 따른 군집(population) 분석을 위하여 CD3, CD45, CD4, CD8 및 NK1.1 항체를 이용하여 면역염색한 후 LSR 유세포분석기(FACS LSR Fortessa™ X-20, BD Biosciences)를 이용하여 각각 보조 T세포, T세포 및 NK 세포의 비장 혹은 간조직 내의 세포 군집을 측정하였다.
- [83] NK 세포들의 활성화 측정을 위하여, NK 세포의 IFN- γ , PRF1 및 GZMB 발현을 측정하였다. 세포들을 5.0 ng/mL PMA(Sigma), 500.0 ng/mL ionomycin(Sigma), 10.0 ng/mL monensin(Sigma)와 4시간동안 37.0°C 및 5.0% CO_2 에서 반응시켰다. Lymphocytes Fc γ II/III 수용체를 Fc Block™(BD)로 blocking하고, surface antigen들은 알맞은 형광 염료와 접합(conjugated)되거나 비오틴이 부착된(biotinylated) 단일클로날 항체로 염색하였다. 그 후 세포들은 Cytofix/Cytoperm™(BD)로 고정하고 스며들게 하였다(permeabilize). IFN- γ , PRF1 및 GZMB와 같은 Intracellular antigens도 알맞은 형광 염료와 접합(conjugated)되거나 비오틴이 부착된(biotinylated) 단일클로날 항체로 염색하였다. 유세포분석은 FACS LSR Fortessa™ X-20(BD)을 이용하여 데이터를 얻고 FlowJo version 10.6.1를 이용하여 분석하였다.
- [84] <실시예 7> qRT-PCR 분석
- [85] TM4SF5를 발현하는 간상피세포 Huh7 및 Hep3B 세포주에 TSAHC를 처리하지 않거나 (0 μM) 다양한 농도(0.02, 0.1, 0.5, 및 2.5 μM)로 처리한 후 세포를 수거하여 qRT-PCR을 수행하였다. qRT-PCR을 수행하기 위하여 세포 또는 조직을 Qiazol (Qiagen, 미국)을 이용하여 세포파쇄한 후 클로로포름(chloroform)을 첨가하여 12,000 x g, 4 °C에서 15분간 원심분리하여 상부의 유기층을 분리하였다. 분리된 유기층에 이소프로판올 (isopropanol)을 첨가하여 RNA를 침강시킨 후 70% 에탄올로 세척하였다. 7,500 x g에서 5분간 원심분리하여 RNA 펠렛을 분리하여 10분간 에탄올을 증발시키고 30 μl DEPC-water에 용액화시켰다. 용액화시킨 RNA는 역전사 kit(Toyobo, 일본)를 이용하여 gDNA 제거 후 역전사하여 cDNA를 얻는다. 얻어진 cDNA는 2x Eva green master mix(Labopass, 대한민국)와 0.4 μM forward/reverse primer를 이용하여 실시간 PCR (Biorad, 미국)로 발현을 측정했다. 발현량의 계산은 Pfaffl의 modified delta-delta Ct 방법을 이용하였다. 본 발명에서 RT-PCR 또는 qRT-PCR을 위한 primer들의 서열은 하기의 표 2에 나타내었다.

[86] [표2]

Gene name	정방향 서열(5'-3')	서열번호	역방향 서열 (5'-3')	서열번호
TM4SF5	CTTGCTCAACCGCACTCTAT	15	ATCCCACACAGTACTATCTCCA	16
SLAMF6	GTCCAGAAATCCACGTGACTAA	17	GTAAGAGCCTGTGTCTTCCATC	18
SLAMF7	TGGGTCTGCAGAGCAATAAG	19	CAGGGCCTTCCAGGTATAAAT	20
MICA	CCTTGGCCATGAACGTAGG	21	CCTCTGAGGCCTCGCTGCG	22
MICB	ACCTTGGCTATGAACGTCAACA	23	CCCTCTGAGACCTCGCTGCA	24
ULBP1	TTTCCTTAAAGGGCAAC TGCT	25	AGGAACTGCCAAGATCCTCT	26
ULBP2	CATTACTTCTCAATGGGAGACTGT	27	TGTGCCTGAGGACATGGCGA	28
ULBP3	CTGATGCACAGGAAGAAGAG	29	TATGGCTTTGGGTTGAGCTAA	30
ULBP5	GACTCGCGTGACTTTACCTATC	31	GGCTGCGCCGTTATTTATTG	32
CD111(Nectin-1)	ATCCTGCTGGTGTTGATTGT	33	TGCTTCTTGGTGCTGTAGTC	34
CD112(Nectin-2)	TTCCCTGGATCTAGAGGATGAG	35	CTTTGCCCTGGTAGGATATCA	36
CD113(Nectin-3)	TTGCTAGAGGAAGGCGAATTAC	37	ACCGAAACTTCAGGAGCATAC	38
CD155(PVR)	AGGTATCCATCTCTGGCTATGA	39	CCATGGTCGTGCTCCATTA	40
CADM1	GCTTCTGCTGTTGCTCTTCT	41	CTCGATCACTGTCACGTCTTTC	42
Klrk1(NKG2D)	CAGCAAAGAGGACCAG	43	GTTAGTAGGTTGGGTG	44

	GATTTA		AGAGAATG	
PRF1	CCCAGTGGACACACAA AGGTT	45	TCGTTGCGGATGCTAC GAG	46
GZMB	CTTCCTGATACGAGACG ACTTC	47	CGGCTCCTGTTCTTTG ATATTG	48
CD107a	CGTCAGCAGCAATGTTT ATGG	49	CATGTTCTTAGGGCCA CTCTT	50
TNF- α	GAGTGACAAGCCTGTA GCCCATGTTGTAGCA	51	GCAATGATCCCAAAG TAGACCTGCCCAGACT	52
FasL	CATTTAACAGGCAAGTC CAACTC	53	CACAAGGCCACCCTTC TTAT	54
TNFSF10(TRAIL)	CAGAGAGTAGCAGCTC ACATAAC	55	CCTTGATGATTCCCAG GAGTTT	56
CD112R	CAGAGCAGCATCTCTCT CATC	57	TCAGGGAAGGACGCA AAC	58
TIGIT	AGGAATGATGACAGGC ACAATA	59	GGAGGAGAGGTGACA TTGTAAG	60
CD226	AGGAGAAGGAGAGAGA GAAGAG	61	GATTGGTAGGTTGACT GGTAGAG	62
CD96	TGGTCCAAGGTCACCAA TAAG	63	TCTCCCATAGGCACAG TAGAA	64
PD-1	CCGCACGAGGGACAAT AG	65	CCATTCCGCTAGGAA AGACAA	66

[87] <1-1> TSAHC가 간의 손상에 미치는 영향 확인

[88] TSAHC 처리가 간의 손상 정도 및 염증 반응에 미치는 영향을 확인하기 위하여, PBS(대조군) 및 DEN을 처리하여 간암 유발 마우스 모델에서 간 손상 정도를 확인하였다.

[89] 구체적으로, 상기 실시예 5에 기재된 방법에 의하여 제조된 DEN 처리군(28주), DEN과 TSAHC를 동시에 처리하는 군(DEN+TSAHC1), DEN 처리 10주 후 TSAHC를 처리하는 군(DEN+TSAHC2) 및 PBS를 처리한 대조군으로부터 간조직을 확보(n=5)하였다. 간조직을 파라핀(paraffin)과 분리하기 위해 60°C오븐에 20분 정도 넣어 파라핀이 녹으면 자일렌(xylene)에 5분씩 3번 담가주었다. 그리고 100%, 90%, 80%, 70% 에탄올 및 증류수 순으로 순차적으로 3분씩 넣어준 뒤 헤마톡실린(hematoxylin) 용액에 5분 담가서 반응시켰다.

수돗물로 충분히 씻어준 후에는 에오신(eosin) 용액에 20분 정도 반응시켜준 다음 다시 수돗물로 씻어주었다. 그 다음 70%, 80%, 90%, 100% 에탄올 및 자일렌 순으로 3분씩 담가주는 탈수화 과정을 거친 후에 슬라이드를 마운팅(mounting)하였고, 간조직을 관찰하였다.

- [90] 그 결과, DEN 처리군의 간조직에서는 PBS를 처리한 대조군에 비하여 간의 손상과 면역세포의 밀집이 두드러졌으며, TSAHC를 동시에 또는 차순으로 처리한 DEN+TSAHC1 및 DEN+TSAHC2 군의 경우, DEN 처리군에 비하여 간의 손상 및 면역세포의 밀집(염증) 정도가 감소함을 확인하였다(도 1).

[91] **<1-2> TSAHC 처리에 따른 생존율 변화 확인**

- [92] TSAHC가 생존율에 미치는 영향을 확인하기 위해, 상기 실험에 1-1의 마우스의 생존율을 28주 동안 측정하였다.

- [93] 구체적으로, 상기 마우스는 온도와 습도가 잘 조절된, 병원균이 없는(pathogen-free) 실험동물실에서 사육되었으며, 각각은 처리군은 5 내지 7마리씩 그룹을 지어 정상 식이의 자유 배식을 통한 정상적인 사육을 하면서 생존율을 측정하였다.

- [94] 그 결과, DEN 처리군의 경우 생존율이 가장 낮게 나타났고, DEN+TSAHC2 군은 DEN 처리군보다 생존율이 높았으나, DEN+TSAHC1 군 및 PBS 처리 대조군(100% 생존)에 비해 생존율이 낮았다(도 2).

[95] **<1-3> 간 손상 및 간암 마우스 모델에서의 TM4SF5, STAT3, pY705-STAT3, p-Erk 및 라미닌 발현 확인**

- [96] 추가적으로, 상기 실험에 1-1의 마우스의 간조직을 이용하여, TM4SF5, STAT3, pY⁷⁰⁵STAT3(STAT3 Tyr705의 인산화), p-Erk(ERK1/2의 인산화) 및 라미닌(Laminin)의 발현 정도를 웨스턴블랏을 통해 확인하였다.

- [97] 구체적으로, 상기 각 대조군 및 처리군의 동물 간조직으로부터 추출액을 얻었다. 간조직을 PBS로 2번 세척한 후, lysis buffer[50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% NP40, 0.25% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1mM EDTA(500 ml기준)]에 SDS, Na₃O₄V, protease inhibitor cocktails(GenDepot)를 넣고 4°C에서 15분 처리하였다. 간 세포의 추출액을 위해서는 lysis buffer(150 mM NaCl, 1% NP-40, 50 mM Tris-HCl, 0.25% sodium deoxycholate, pH 7.4)에 protease inhibitor cocktail(GenDEPOT)를 포함하여 사용하였다. 4°C 13000 rpm으로 30분 동안 원심분리한 후, 새 microcentrifuge-tube에 상층액만을 옮겨주었다. BCA reagent(Thermo Scientific)를 이용하여 정량해준 후, 4x sample buffer[100% glycerol 4 ml, Tris-HCl, pH6.8, 2.4 ml, SDS 0.8 g, Bromophenol blue 4 mg, beta-mercaptoethanol 0.4 ml, H₂O 3.1 ml(10 ml기준)]를 넣어준 후, 5분 동안 100°C에서 끓였다. 위의 시료로 SDS-PAGE 전기영동을 수행한 뒤, Nitrocellulose Membranes Protran 니트로셀룰로오스 membrane(Whatman)에 이동시킨 후, 5% 탈지분유단백질(skim milk protein)로 1시간 동안 전처리하였고, 전처리 후, pY⁷⁰⁵STAT3(Millipore, 미국), 라미닌, STAT3(이상 Santa Cruz, 미국) 및 p-Erk의 1차

항체를 사용하여 4°C에서 15시간동안 반응시켰다. 다음날 2차 항체를 반응시키고, ECL(Pierce, 미국)을 이용하여 엑스레이 필름에 현상하였다. Anti-TM4SF5_{C-ter}(epitope region of RKKQDTPH¹⁹⁷)는 전문항체제작회사(Pro-Sci, Poway, CA, USA)에서 주문 제작하였다.

- [98] 그 결과, PBS를 처리한 대조군에 대비하여 DEN 처리군에서 pY⁷⁰⁵STAT3, p-Erk 및 라미닌의 발현이 TM4SF5 발현 향상과 더불어 증가하였으며, DEN+TSAHC1 군에서의 TM4SF5의 발현 수준은 DEN 처리군과 큰 차이가 없었으나, pY⁷⁰⁵STAT3 및 라미닌의 발현이 낮아졌으며 DEN+TSAHC2 군에서는 pY⁷⁰⁵STAT3의 수준이 DEN 처리군보다 낮아졌다(도 3).
- [99] 상기 결과는 DEN 처리에 의한 간 손상 및 간암유도 동물모델에서 TM4SF5의 발현과 더불어 STAT3 Tyr705 인산화 및 라미닌의 발현이 간 손상 및 면역세포의 밀집을 통한 염증 반응의 증가 및 마우스 생존율의 저하로 연결될 수 있음을 시사한다.
- [100] **<1-4> 간 손상 및 간암 마우스 모델에서의 TM4SF5, STAT3, pY705-STAT3, 콜라젠, 라미닌 및 라미닌 γ 2 발현 확인**
- [101] 상기 실험에 1-1의 마우스의 간조직에서 TM4SF5, STAT3, pY⁷⁰⁵STAT3 (STAT3 Tyr705의 인산화), 콜라젠, 라미닌 및 라미닌 γ 2의 발현 정도를 확인하기 위하여 H&E 및 immunohistochemistry를 수행하였다.
- [102] 그 결과, PBS 처리군과 대비하여 DEN 처리군에서는 간의 손상이 증가하였고, TM4SF5, Tyr705가 인산화된 STAT3, 콜라젠, 라미닌 및 라미닌 γ 2의 발현이 향상되었음을 확인하였다. 또한, 이러한 DEN에 의한 효과는 TSAHC를 처리함에 따라 감소함을 확인하였다(도 4).
- [103] **<실험예 2> TSAHC 처리에 따른 간 손상 및 간암 발병, 대사 기능 조절 및 면역세포 침투 사이의 상관성 확인**
- [104] **<2-1> TSAHC 처리에 따른 간 손상 및 간암 발병 상관성 확인**
- [105] 2주령의 C57BL/6 정상 WT 마우스 및 Tm4sf5^{-/-} KO 마우스 수컷에 vehicle을 처리하거나 (Age-matched 대조군), DEN(25 mg/kg 체중)을 1회 복강(IP) 주사하고, 1주일에 2회씩 DMSO (40% DMSO) 혹은 TSAHC (5 mg/kg 체중/40% DMSO) 복강(IP) 주사하여 처리하였다 (도 5). 45 주 동안 처리한 후, 간 조직을 확보하여 이미지를 촬영하고 맨눈으로 암 결절 (nodule) 혹은 종양을 확인하고 크기와 개수를 조직마다 조사하였다.
- [106] 그 결과, Age-matched 대조군의 WT 및 KO 마우스 그룹은 종양이 생성되지 않았으나, DEN을 처리한 WT 마우스(WT+DEN)에서는 크고 작은 종양들이 많이 생성되었다. 하지만, KO 마우스에서는 DEN을 처리하였음(KO+DEN)에도 불구하고 종양이 생성이 훨씬 미약하였으며, DEN을 처리한 WT 마우스에 TSAHC를 동시에 처리한 그룹(WT+DEN+TSAHC)에서는 종양의 형성이 TSAHC를 처리하지 않은 그룹에 비하여 훨씬 작고 적게 생겼다(도 6).
- [107] 또한, 지름이 1.0 mm 이상인 종양의 숫자 및 총 부피, 각 동물에서 최대 종양의

크기를 분석하였을 경우, DEN을 처리한 WT 마우스의 경우 가장 그 값들이 컸고 KO+DEN 마우스의 경우는 통계적으로 유의미하게 감소하였다. 그리고 WT+DEN+TSAHC에서는 WT+DEN보다 감소하는 경향이 있음을 확인하였다(도 7a 내지 7c).

- [108] 또한 각 그룹의 간조직에서의 종양을 관찰하기 위하여 H&E 염색 또는 immunohistochemistry를 수행하였다.
- [109] 구체적으로, 대표적인 동물의 간조직을 디지털카메라로 촬영하였고(좌측) digital tissue scanner로 염색된 조직을 scanning(중간 패널)하여 그 이미지의 종양(T) 및 정상(N) 조직 부위를 표현(오른쪽 패널)하였다. DEN 처리된 정상마우스에서 생긴 큰 종양의 정상조직과의 경계 부위를 표현하고자 하였다. 그뿐만 아니라, H&E 염색에 이어, 간암 조직의 증식력과 바이오마커의 발현 정도를 조사하기 위하여 Ki67 및 α -fetoprotein (AFP)를 면역염색하였다(도 8).
- [110] **<2-2> TSAHC 처리에 따른 간 손상 및 암 발병과 대사 기능 조절 사이의 상관성 확인**
- [111] TSAHC 처리에 따른 간 손상 및 암 발병과 대사 기능 조절 사이의 상관성 확인하기 위해 상기 실험에 2-1의 마우스로부터 간조직을 확보한 후, 마우스의 간/체중의 비율을 측정하였다. 또한, 상기 마우스로부터 얻어진 혈액을 1 M EDTA coating된 1.5 ml tube에 8 μ l 1 M EDTA 첨가 후 1,500x g, 4°C에서 15분간 원심분리하여 혈청을 분리하였고, 분리된 혈청은 혈액 분석기 (Dri-chem 4000, Fuji, Japan)를 이용해 ALT (Alanine aminotransferase), 콜레스테롤(T-CHO) 및 글루코스 (Glucose)의 양을 측정하였다.
- [112] 그 결과, DEN을 처리한 정상 마우스인 WT+DEN 군은 age-matched 대조군과 대비하여 간/체중의 비율, ALT, T-CHO 및 글루코스의 수치가 모두 높았으나, DEN을 처리한 KO 마우스(KO+DEN 군)나 TSAHC와 함께 처리된 마우스(WT+DEN+TSAHC 군)는 상기 수치들이 대체로 낮아지는 경향을 보였다(도 9a 내지 9d).
- [113] 즉, DEN 처리 때문에 암이 생긴 경우에, 간/체중의 비율, ALT 간수치, 혈액 속에 콜레스테롤 및 글루코스의 수준이 높아지고, KO 마우스 혹은 TSAHC 처리 때문에 TM4SF5의 기능이 억제되어 암이 적게 생긴 동물 그룹에서 그들의 값들이 낮게 확인된 것은 간 손상 및 간암 발병과 TM4SF5 및 염증-대사 기능과의 상관성이 있음을 나타낸다.
- [114] **<2-3> 면역세포 침투와 종양 형성 사이의 상관성 확인**
- [115] 면역세포 침투와 종양 형성 사이의 상관성을 확인하기 위해, 상기 실험에 2-1의 마우스로부터 간조직을 확보한 후, 실험에 1-1에 기재된 방법과 동일한 방법으로 H&E 염색을 수행하였으며, AFP(α -fetoprotein)으로 면역염색을 수행하였다.
- [116] 그 결과, 정상마우스에 DEN만을 처리한 WT+DEN 군에서는 면역세포의 침투 및 밀집을 나타내는 육아종염증(noninfectious granulomatous inflammation with immune cell infiltrates)이 확연히 관찰되었고, 주변에 AFP의 염색 정도가 높음을

확인하였다(도 10). 그러나, WT+DEN+TSAHC 군은 AFP의 염색 정도가 다소 낮고 육아종염증(granulomatous inflammation)의 부분들이 심각하게 관찰되지 않아, TSAHC 처리에 따라 면역세포들이 침투가 억제되는 것과 염증 및 종양 형성이 둔화된 것이 서로 상호관계가 있음을 확인할 수 있었다.

[117] <실험예 3> TSAHC가 NK 세포의 군집 또는 이로부터 분비되는 싸이토카인 혹은 과립(granule)들에 미치는 영향 확인

[118] <3-1> TSAHC가 비장 내 면역세포 군집에 미치는 영향 확인

[119] TSAHC 처리 여부에 따른 비장 내 면역세포 군집의 상태를 확인하기 위해, 2주령의 C57BL/6 정상 WT 마우스 및 *Tm4sf5*^{-/-} KO 마우스 수컷에 vehicle을 처리하거나(Age-matched 대조군), DEN(25 mg/kg 체중)을 1회 IP 주사하고, 1주일에 2회씩 DMSO(40% DMSO) 혹은 TSAHC(5 mg/kg 체중/40% DMSO) IP 주사하여 처리하였다. 45주가 지난 후, 비장에서 T세포 및 NK 세포 등의 면역세포들을 상기 실시예 6에 기재된 면역염색법과 유세포분석법을 통하여 면역세포들을 조사하였다.

[120] 상기 방법을 통해, CD3가 높게 발현하는 세포들 중 CD4가 높게 존재(CD4+)하는 보조 T세포(Helper T cell), CD8이 높게 존재(CD8+)하는 세포독성 T세포(cytotoxic T cell) 또는 CD3의 발현이 낮고 NK1.1의 발현이 높은 NK 세포를 포함하여 면역세포의 군집(population)을 조사하였다. 그 결과, 간암이 크고 많이 생긴 WT+DEN 군의 경우, 보조 T세포의 군집은 크게 변하지 않았고(도 11b), 세포독성 T세포의 경우 오히려 군집이 증가하여, 상기 T세포가 암 발병에 유의적으로 기여하지 않음을 확인하였다(도 11c). 그러나, NK 세포의 경우, WT+DEN 군은 대조군과 대비하여 NK 세포의 군집이 감소하였다. 또한, DEN 처리하였으나 유전자 *Tm4sf5*가 녹아웃(KO)된 KO+DEN 군이나 TSAHC 처리에 따라 TM4SF5 단백질 활성이 억제된 실험군은 NK 세포의 군집이 증가하였다(도 11d). 이는, TM4SF5-의존적 DEN 처리에 따른 간의 손상과 간암 발병은 비장에 존재하는 NK 세포의 군집과 유의적인 연관성이 있음을 시사한다.

[121] <3-2> TSAHC가 간조직 내 면역세포 군집에 미치는 영향 확인

[122] TSAHC 처리 여부에 따른 간조직 내 면역세포 군집의 상태를 확인하기 위해, 2주령의 C57BL/6 정상 WT 마우스 및 *Tm4sf5*^{-/-} KO 마우스 수컷에 vehicle을 처리하거나(Age-matched 대조군), DEN(25 mg/kg 체중)을 1회 IP 주사하고, 1주일에 2회씩 DMSO(40% DMSO) 혹은 TSAHC(5 mg/kg 체중/40% DMSO) IP 주사하여 처리하였다. 45주가 지난 후, 비장에서 T세포 및 NK 세포 등의 면역세포들을 상기 실시예 6에 기재된 면역염색법과 유세포분석법을 통하여 면역세포들을 조사하였다.

[123] 상기 방법을 통해, 각 실험군의 간조직 내의 보조 T세포(Helper T cell), 세포독성 T세포(cytotoxic T cell) 및 NK 세포의 군집(population)을 조사한 결과, 간암이 크고 많이 생긴 WT+DEN 군의 경우에, 보조 T세포의 군집은 크게 낮아졌지만(도 12b), 오히려 세포독성 T세포의 군집은 과도하게 증가하여, 보조

T세포와는 달리 상기 세포독성 T세포가 암 발병에 유의적으로 기여하지 않음을 확인하였다(도 12c). 또한, NK 세포의 경우에는, WT+DEN 군이 대조군에 비하여 NK 세포의 군집이 증가하여, 간조직에 존재하는 NK 세포의 기능이 조절되어 암 발병이 조절되었다고 추정할 수 없었다(도 12d). 그러나, DEN을 처리하였을지라도 유전자 *Tm4sf5*가 KO 되었거나 TM4SF5 단백질이 TSAHC 처리 때문에 억제된 경우에는 NK 세포의 군집이 다소 감소하였다. 이로 인해 TM4SF5-의존적 DEN 처리에 따른 간암 발병은 간조직에 존재하는 NK 세포의 군집과는 관련이 없거나 미약함을 확인하였다. 한편, 유전자 *Tm4sf5*가 녹아웃(KO)되었을 경우에는 CD4⁺한 보조 T세포 군집이 증가하여 간 손상과 암을 억제할 수 있었던 것으로 추정되었다.

[124] <3-3> TSAHC가 간조직 내 자연 살상 세포로부터 분비되는 싸이토카인 혹은 과립(granule)들에 미치는 영향 확인

[125] 간조직에 존재하는 NK 세포의 활성화와 간암 발병률과의 상관성을 확인하기 위하여, 간조직에 존재하는 NK 세포로부터 분비되는 싸이토카인(cytokine) 및 과립(granule)을 상기 실시예 6에 기재된 면역염색법 및 유세포분석법을 통하여 조사하였다.

[126] 그 결과, 암이 크고 많이 생긴 WT+DEN 군에서는 암이 생기지 않은 대조군에 대비하여 IFN- γ , perforin(PRF1) 및 granzymes(GZMB)이 훨씬 낮게 분비되었다(도 13a 내지 13c). 특히, DEN을 처리하였을지라도 TSAHC 처리에 따라 TM4SF5 단백질의 활성화가 억제된 경우에는, NK 세포의 PRF1 수준이 통계적으로 유의미하게 높아짐으로써 (그래서 활성화된 NK 세포가 암세포를 표적하여 죽이는 기능이 높아져) 암의 발병이 억제될 수 있었던 것으로 추정되었다. 그러나, IFN- γ 및 granzymes(GZMB) 경우에는 그렇게 유의미한 차이를 나타내지 않았다.

[127] <실험예 4> TSAHC 처리에 의한 NK 세포의 세포 독성(cytotoxicity) 활성화 유도 가능성 확인

[128] <4-1> TM4SF5 발현 억제가 NK 세포의 세포 살상 기능에 미치는 영향 확인

[129] NK 세포인 NK92의 세포 살상 기능 분석을 위하여 LDH(lactate dehydrogenase) Cytotoxicity Assay Kit(Cytotoxicity Detection Kit Plus (ROCHE))을 사용하였다. Huh7 혹은 HepG2 간상피세포 또는 간암세포를 target 세포(RPMI-1640 with 1.0% FBS)로써 0.5×10^4 cells/well(50 μ l)로 96 well-plate에 3 반복으로 준비하였다. IL-2를 미리 처리한 NK92 세포를 effector 세포로서 1.0×10^6 cells/ml로 준비하여, 다양한 농도의 NK 세포(1.0×10^6 , 0.5×10^6 , 0.25×10^6 , 및 0.125×10^6 cells/ml)를 공동배양하기 위해 준비하였다. 준비된 농도의 NK 세포 용액을 96 well-plate에 존재하는 target 세포에 첨가하여 transwell chamber system에서 effector 대비 target 세포 비율(E:T = 1.25:1, 2.5:1, 5:1 또는 10:1)가 되도록 옮겨 담았다. 세포들은 96-well plates에서 4시간 동안 37.0°C 및 5.0% CO₂에서 배양하였다. 경우에 따라서, TSAHC[4'-(*p*-toluenesulfonylamido-4-hydroxychalcone), 1.0 혹은 5.0 μ M]

혹은 대조군 화합물(negative control compound; 4'-methoxy-4-dihydroxychalcone, 1.0 μ M)를 미리 1시간동안 target 세포에 처리한 후, NK92 세포와 공동배양 4시간동안 유지되었다. 사멸된 target 세포로부터 분비된 LDH를 ELISA reader를 이용하여 492-690 nm에서 흡광도를 측정하였다. NK92 세포에 의한 세포 사멸의 정도(%)는 하기의 식으로 계산되었다:

[130]

$$\text{Cytotoxicity(\%)} = \frac{(\text{effector} - \text{target cell mix} - \text{effector cell control}) - \text{low control}}{\text{high control} - \text{low control}} \times 100$$

[131] 경우에 따라서, transwell chamber system을 공동배양 후, NK92 세포 혹은 target 간암세포를 분리하여 qRT-PCR 혹은 웨스턴블랏을 수행하였다.

[132] 먼저, TM4SF5가 내인성(endogenous)으로 발현하는 Huh7 간상피세포에 non-specific shRNA (NS), shTM4SF5(#2 혹은 #4 sequence)를 렌티바이러스로 감염시킨 후, qRT-PCR로 *TM4SF5* mRNA 수준을 확인함으로써, TM4SF5의 발현을 억제하기 위한 shTM4SF5의 효능을 확인하였다(도 14a). 또한, 96-well 플레이트에 Target(표적, T) 세포(0.5×10^4 cells)로서 TM4SF5의 발현이 유지되거나(NS) 억제된(shTM4SF5 #2 혹은 #4) 간암세포를 넣고, Effector (E) 세포로서 NK92 세포를 주어진 비율(E:T 비율; effector 대비 target 세포 수)로 섞어 4시간동안 37°C 5% CO₂에서 배양한 후, LDH(lactate dehydrogenase) assay kit(Abcam)로 ELISA reader를 이용해서, 각 조건마다 492-690 nm에서의 세포의 사멸에 따라 생성된 formazan(LDH)의 양을 흡광도로 측정함으로써 비교 측정하였다.

[133] 그 결과, 각 E:T 비율에서 TM4SF5의 발현이 유지된 세포보다 억제된 표적세포의 사멸이 더욱더 높음을 확인하였다(도 14b). 이로써, TM4SF5가 발현되지 않을 경우 NK 세포의 세포 독성(cytotoxicity)이 활성화된 것으로 추정되었다.

[134] <4-2> TM4SF5 발현 억제가 NK 세포의 세포 독성 활성화 리간드에 미치는 영향 확인

[135] TM4SF5의 발현 억제가 NK 세포의 세포 독성 활성화와 관련된 리간드(Ligand)에 미치는 영향을 확인하기 위해, TM4SF5를 내인성(endogenous)으로 발현하는 간상피세포 또는 간암 세포주(Huh8, Hep3B 및 HepG2)들에 non-specific control shRNA(NS) 또는 shTM4SF5(#4 서열 표적)을 발현하는 렌티바이러스로 감염시킨 간암세포(target 세포)들에서, NK 세포의 세포 독성 활성화에 관련한 여러 리간드 막단백질들을 qRT-PCR로 확인 비교하였다.

[136] 도 15a 내지 15c와 같이, NS가 주입된 target 세포주와 비교해 TM4SF5의 발현이 억제된 target 세포주에서 발현이 1.5배 이상 높아진 리간드들은 흰색으로 표시되었고, 3가지 target 세포주 종류 중 최소한 2가지 이상의 세포주에서 *MICA*, *MICB*, *CADM1*, *SLAMF6*, *SLAMF7*, *ULBP1*, *ULBP3*, *Nectrin-1* 및 *Nectrin-2*들이

발현이 높아진 것을 확인하였다.

- [137] 간상피세포 또는 간암세포와 NK92 세포를 공동배양을 한 후에, NK92 세포주에서의 활성화를 위한 수용체 막단백질들의 mRNA 수준을 qRT-PCR로 확인한 결과, (target 세포의 MICA 및 MICB와 결합하는) NK92 세포의 *NKG2D*, (target 세포의 SLAMFs와 결합하는) *SLAMF6* 및 *SLAMF7*의 mRNA 발현이 TM4SF5가 발현이 유지된 세포보다 발현이 억제된 간암세포(target 세포)와 공동배양되었을 때 NK92 세포에서 더 높아짐을 확인하였다(도 16a).
- [138] 또한, 간상피세포 또는 간암세포와 NK92 세포의 공동배양을 한 후에, NK92 세포주에서의 활성화 정도를 NK92 세포가 분비하는 싸이토카인(cytokine) 및 과립(granule)들을 qRT-PCR로 분석한 결과, *PRF1*(perforin), *GZMB*(granzyme), *CD107a*(Cluster of Differentiation 107a, 혹은 lysosomal-associated membrane protein 1, LAMP1), *TNF- α* (tumor necrosis factor- α), *FasL*(Fas ligand), 및 *TRAIL*(TNF-related apoptosis-inducing ligand)의 mRNA들이, TM4SF5가 발현이 높은 간암세포보다 발현이 억제된 간암세포(target 세포)와 공동배양되었을 때, NK92 세포에서 더 높아짐을 확인하였다(도 16b).
- [139] 이로써, target 세포에 TM4SF5 발현이 억제되면, NK 세포를 활성화시킬 수 있는 상기 리간드들과 리셉터들이 각각 target 세포인 간암세포 및 effector 세포인 NK92 세포에서도 함께 높아지게 되어, NK 세포의 세포 독성 활성화에 의한 target 세포의 사멸이 유도됨을 확인할 수 있었다.
- [140] **<4-3> 간암(HCC) 조직에서의 TM4SF5, SLAMF7, MICA 및 ULBP1 및 ULBP2의 mRNA 발현 수준 확인**
- [141] 공개적인 데이터베이스 Gene Expression Omnibus (GEO, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) database (accession numbers GSE14520)로부터 'Analyze with GEO2R'를 이용하여 정상 및 간암환자들 중에 TM4SF5가 간암에서 높게 발현되는 경우(각각 n=143)의 SLAMF7 (SLAM Family Member 7), MICA(MHC class I polypeptide-related sequence A) 및 ULBP1(UL16 Binding Protein 1) 및 ULBP2의 mRNA 발현 수준을 비교하였다.
- [142] 그 결과, 정상간에 대비하여 간암환자의 간조직에서 TM4SF5의 mRNA 발현이 의미있게 증가하였고, SLAMF7, MICA 및 ULBP1의 mRNA 발현은 통계적으로 유의미하게 감소하였으며, 이에 TM4SF5와 이들 유전자의 발현이 길항적 혹은 음의 상관 (negative correlation) 관계로 조절된다는 것을 알 수 있었다(도 17).
- [143] **<4-4> target 세포의 리간드 발현 향상을 위한 세포 내부 신호전달 활성화 확인**
- [144] Target 세포의 리간드 발현 향상을 위한 세포 내부 신호전달 활성을 확인하기 위하여, TM4SF5가 내인성(endogenous)으로 발현하는 HepG2 세포에게 non-specific shRNA(NS), shTM4SF5(#2 혹은 #4 sequence)를 렌티바이러스로 감염시킨 후 NK92 세포와 4시간 동안 공동배양하였다. 공동배양하기 전, qRT-PCR로 *TM4SF5* mRNA 수준을 HepG2 세포에서 확인하여 shTM4SF5가 효율적으로 TM4SF5의 발현을 억제함을 확인하였다 (도 18a). 공동배양한 후,

target 세포의 사멸 정도를 확인하였을 경우, TM4SF5가 발현이 억제되었을 때 (NK92 세포에 의해) 사멸되는 수준이 더 높음을 확인하였다(도 18b).

[145] 공동배양한 후, 부착세포인 간암세포와 별도로, 비부착세포인 NK92 세포를 구하기 위해, 배양액 부분을 취하여 원심분리함(850 X g, 5분간)으로써 온전한 NK92 세포를 분리하였다. 분리된 NK92 세포의 추출액을 얻어 웨스턴블랏을 수행하여, NK 세포주 활성화를 위한 target 세포에서의 receptor 발현 향상을 위한 세포 내부 신호전달 활성을 확인하고자 하였다.

[146] 그 결과, TM4SF5의 발현이 억제된 target 세포와 공동배양을 하였던 NK92 세포에서 ERK1/2(extracellular signal-regulated kinase 1과 2)의 인산화가 증가함을 확인할 수 있었다(도 19). 즉, 높아진 ERK1/2의 활성화에 따라 NK92 세포의 리간드 발현이 향상될 수 있었음을 추정할 수 있었다.

[147] 또한, 공동배양을 통해 NK92 세포에 의한 Huh7 target 세포의 사멸 유도율, TM4SF5의 억제제인 TSAHC를 공동배양 1시간 전에 target 세포에 처리한 후 6시간에 걸친 공동배양을 통해 확인하였다. Vehicle 처리에 대비하여 negative control compound(4'-methoxy-4-dihydroxychalcone)는 차이가 별로 없었으나, TSAHC를 처리하면 농도-의존적으로 유의하게 NK92 세포와 공동배양된 target 세포의 사멸이 증가함을 확인하였다(도 20).

[148] **<4-5> TSAHC 처리에 의한 NK 세포 활성화 가능성 확인**

[149] TM4SF5를 발현하는 Huh7 세포주에 대조 shRNA (NS)를 주입하여 발현 억제를 하지 않거나 shTM4SF5(#2 혹은 #4 서열 표적)를 주입하여 TM4SF5의 발현을 억제한 세포들로부터(왼쪽), SNU449 세포에 대조 발현 벡터(SNU449C_p) 또는 TM4SF5 벡터를 발현(SNU449T_p 혹은 SNU449T₇)하는 렌티바이러스로 감염시킨 세포들로부터 세포추출액을 확보하여 웨스턴블랏을 수행하였다.

[150] 그 결과, TM4SF5가 발현하는 세포들의 경우에서 (NK92 세포를 활성화시킬 수 있는) 막단백질 리간드(SLAMF7 및 MICA/B)가 감소함을 확인하였다(도 21). 즉, 이는 TSAHC 처리에 따라 TM4SF5의 기능 내지는 활성이 억제될 경우, 촉진성 리간드(stimulatory ligand)들이 증가하여 궁극적으로 NK 세포의 활성화가 가능하게 되어 암의 형성이 억제될 것으로 추정되었다.

[151] 또한, SNU449 세포에 대조 발현 벡터 (EV) 혹은 TM4SF5 벡터를 발현(TM4SF5)하는 레트로바이러스로 감염시킨 세포들에 TSAHC를 처리하지 않거나 (0), 0.5, 1.0, 혹은 2.0 μ M로 24 시간 동안 처리한 후, 세포추출액을 확보하여 SLAMF 단백질에 대한 웨스턴블랏을 수행하였다.

[152] 그 결과, TSAHC를 처리하지 않은 경우에는 TM4SF5가 발현된 경우에 SLAMF6가 발현하지 않는 경우에 대비하여 감소하지만, TSAHC를 처리하면 TM4SF5가 발현하지 않는 세포에서는 SLAMF6가 증가하지 않지만, TM4SF5를 발현하는 세포에서는 TSAHC를 처리하지 않은 경우에 대비하여 TSAHC 처리한 경우 SLAMF6가 증가함을 확인하였다. 즉, 상기의 결과는 TM4SF5의 기능 혹은 활성을 억제하는 TSAHC 처리가 자연살상 세포를 활성화하는 리간드의 발현을

- 향상시켜 자연살상세포의 항암면역 기능을 높일 수 있음을 시사한다 (도 22).
- [153] 또한, SNU449 세포에 EV 혹은 TM4SF5 벡터를 발현(TM4SF5)하는 레트로바이러스로 감염시키거나, TM4SF5의 발현을 억제한 Huh7-KO 세포주에 다시 EV(대조군 벡터) 혹은 TM4SF5 벡터를 주입하여 얻은 세포주의 세포추출액을 확보하여 NK92 세포를 활성화시킬 수 있는 막단백질 리간드에 대한 웨스턴블랏을 수행하였다.
- [154] 그 결과, TM4SF5가 발현하는 세포들의 경우에서 (NK92 세포를 활성화시킬 수 있는) 막단백질 리간드들 [SLAMF6, SLAMF7 및 MICA/B (MHC Class I Polypeptide-Related Sequence A/B) 등]의 발현이 감소하였다(도 23a 및 23b). 상기의 결과는 TM4SF5의 발현이 NK세포의 면역관문(immune check point)으로 추정됨을 시사한다. 이는 NK 세포 활성화를 위한 리간드들(NKG2D 및 SLAMF6/7)의 발현이 낮아지게 되어, 궁극적으로 이에 상응하는 NK 세포에 존재하는 수용체들의 발현 또는 활성이 저하되게 되고, 이는 NK 세포의 target 세포에 대한 세포 독성 활성의 저하로 이어져 target 세포의 생존/증식이 가능해지는 면역회피 기능이 생기는 것이라고 추정할 수 있다.
- [155] 이로써, TM4SF5가 간암 상피세포에 발현하면, MICA/B 및 SLAMF6/7과 같은 리간드들이 간암 target 세포에서 낮아지고, 이는 NK 세포 활성화를 위한 리간드들(NKG2D 및 SLAMF6/7)의 발현이 ERK1/2 신호전달 활성의 저하에 따라 NK 세포에서 발현이 낮아져, 궁극적으로 NK 세포의 target 세포의 사멸 활성이 저하됨으로써 target 세포의 생존 및 증식이 가능해지는, 면역회피 기능이 생긴다고 추정할 수 있었다. 따라서, TSAHC 처리는 면역관문인 TM4SF5를 억제하는 약물로서 NK 세포의 면역관문억제제가 될 수 있다.
- [156] 또한, 인간 NK세포주인 NK92 세포에 EV 혹은 TM4SF5 벡터를 발현(TM4SF5)하는 레트로바이러스로 감염시킨 세포들(왼쪽) 혹은 TM4SF5를 발현을 낮아주시킨 Huh7-KO 세포주에 새로이 EV 혹은 TM4SF5 벡터를 주입하여 얻은 세포들로부터(오른쪽), 세포추출액을 확보하여 NK92 세포를 활성화를 억제할 수 있는 막단백질 리간드와 수용체에 대한 웨스턴블랏을 수행하였다.
- [157] 그 결과, TM4SF5를 발현하는 NK세포 및 간상피세포에서 (NK92 세포를 활성화를 억제할 수 있는) 막단백질 리간드인 PD-L1(programmed death-ligand 1)과 수용체인 PD-1(programmed cell death protein-1)이 각각 증가하였다(도 24a 및 24b). 상기의 결과는 TM4SF5의 발현이 간상피세포에서 PD-L1의 발현을 증가시키고 NK92 세포에서 그 수용체인 PD-1의 발현을 증가시켜, NK 세포의 활성이 저하되고, 궁극적으로 NK 세포의 target 세포에 대한 세포 독성 활성이 저하됨으로써 target 세포의 생존/증식이 가능해지는, 면역회피 기능이 생긴다고 추정할 수 있다.
- [158] 또한, TM4SF5를 발현을 낮아주시킨 Huh7-KO 세포주에 새로이 EV 혹은 TM4SF5 벡터를 주입하여 얻은 세포 (위 패널) 혹은 인간 NK세포주인 NK92

세포에 EV 혹은 TM4SF5 벡터를 발현(TM4SF5)하는 레트로바이러스로 감염시킨 세포들(아래 패널)를 이용하여 qRT-PCR을 수행하여 각 유전자들의 mRNA 수준을 확인하였다.

- [159] 그 결과, TM4SF5를 발현하는 간상피세포 (Huh7) 및 NK92 세포에서 (NK92 세포를 활성화할 수 있는) 막단백질 리간드인 CD112 [Nectin-2, Poliovirus receptor-related 2 (PVRL2)], CD111 [Nectin-1, Poliovirus receptor-related 1 (PVRL1)] 과 수용체인 CD112R (CD112 receptor), TIGIT (T cell immunoglobulin and ITIM domain), CD96 (Tactile, T Cell-Activated Increased Late Expression Protein) 및 PD-1이 각각 증가하였다(도 25a 및 25b). 그러나, NK세포의 활성을 억제하지 않고 향상시킨다고 알려진 CD226 (Cluster of Differentiation 226)의 발현은 증가하는 경향이 있었다. 이는 TM4SF5의 발현이 NK 세포 활성화 억제를 위한 리간드들을 간상피세포에서 증가시키고, NK92 세포에서 그 수용체들의 발현을 증가시킴을 확인한 것으로, 궁극적으로 NK 세포의 활성 저하로 이어져, NK 세포의 target 세포에 대한 독성 활성이 저하됨으로써 target 세포의 생존/증식이 가능해지는 면역회피 기능이 생긴다는 것을 시사한다.

청구범위

- [청구항 1] 4'-(p-톨루엔설폰아미노)-4-하이드록시칼콘 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 자연 살상 세포(Natural killer cell, NK cell) 활성화 조절용 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 4'-(p-톨루엔설폰아미노)-4-하이드록시칼콘 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 간의 손상, 면역세포의 밀집 또는 염증을 억제하는 것을 특징으로 하는, 자연 살상 세포 활성화 조절용 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 4'-(p-톨루엔설폰아미노)-4-하이드록시칼콘 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 간조직에서의 면역세포의 밀집 정도, Ki67 또는 AFP(Alpha-fetoprotein) 단백질의 발현 정도, 또는 육아종염증의 형성을 감소시키는 것을 특징으로 하는, 자연 살상 세포 활성화 조절용 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 4'-(p-톨루엔설폰아미노)-4-하이드록시칼콘 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 간조직에서의 TM4SF5 또는 콜라겐(collagen), 라미닌(Laminin), 라미닌 $\gamma 2$ (Laminin $\gamma 2$)의 발현을 억제하거나, STAT3(Signal transducer and activator of transcription 3)의 Tyrosine 705 또는 ERK1/2의 인산화의 증가를 억제하는 것을 특징으로 하는, 자연 살상 세포 활성화 조절용 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 4'-(p-톨루엔설폰아미노)-4-하이드록시칼콘 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 분리된 시료 내 ALT(Alanine aminotransferase), 콜레스테롤(Cholesterol) 또는 글루코스(Glucose) 수치를 낮추는 것을 특징으로 하는, 자연 살상 세포 활성화 조절용 조성물.
- [청구항 6] 제5항에 있어서,
상기 분리된 시료는 혈액, 전혈, 혈청 및 혈장으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 자연 살상 세포 활성화 조절용 조성물.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 4'-(p-톨루엔설폰아미노)-4-하이드록시칼콘 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 비장 내 자연 살상 세포의 군집을 증가 또는 간 조직내의 살상 세포를 활성화시키는 것 혹은 CD4(cluster of differentiation 4)⁺ 양성 보조 T 세포의 군집을 증가시키는 것을 특징으로 하는, 자연 살상 세포 활성화 조절용 조성물.
- [청구항 8] 제1항에 있어서,
상기 4'-(p-톨루엔설폰아미노)-4-하이드록시칼콘 또는 이의 약학적으로

- 허용가능한 염은 간에서 종양의 형성, 종양의 숫자, 종양의 부피 및 최대 종양의 크기로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 감소시키는 것을 특징으로 하는, 자연 살상 세포 활성 조절용 조성물.
- [청구항 9] 제1항에 있어서,
상기 4'-(p-톨루엔설폰아미노)-4-하이드록시칼콘 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 표적 세포에서 MICA(MHC class I polypeptide-related sequence A), MICB(MHC class I polypeptide-related sequence B), CADM1(Cell adhesion molecule 1), SLAMF6(SLAM family member 6), SLAMF7(SLAM family member 7), ULBP1(UL16-binding protein 1), ULBP2(UL16-binding protein 2), ULBP3(UL16-binding protein 3), Nectin-1(Nectin Cell Adhesion Molecule 1) 및 Nectin-2(Nectin Cell Adhesion Molecule 2) 로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는, 자연 살상 세포 활성 조절용 조성물.
- [청구항 10] 제8항에 있어서,
상기 표적 세포는 손상된 간 세포, 조직, 또는 간암세포인 것을 특징으로 하는, 자연 살상 세포 활성 조절용 조성물.
- [청구항 11] 제1항에 있어서,
상기 4'-(p-톨루엔설폰아미노)-4-하이드록시칼콘 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 자연 살상 세포에서 NKG2D(natural killer receptor group 2 member D), SLAMF6 또는 SLAMF7로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는, 자연 살상 세포 활성 조절용 조성물.
- [청구항 12] 제1항에 있어서,
상기 4'-(p-톨루엔설폰아미노)-4-하이드록시칼콘 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 자연 살상 세포에서 PRF1(Perforin), GZMB(Granzyme B), CD107a(Cluster of Differentiation 107a, 혹은 lysosomal-associated membrane protein 1, LAMP1), TNF- α (Tumor necrosis factor- α), FasL(Fas ligand) 및 TRAIL(TNF-related apoptosis-inducing ligand)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는, 자연 살상 세포 활성 조절용 조성물.
- [청구항 13] 제1항에 있어서,
상기 4'-(p-톨루엔설폰아미노)-4-하이드록시칼콘 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 간상피세포에서 CD112 [Nectin-2, Poliovirus receptor-related 2 (PVRL2)], CD111 [Nectin-1, Poliovirus receptor-related 1 (PVRL1)], PD-L1(programmed death-ligand 1)의 발현을 억제시키는 것을 특징으로 하는, 자연 살상 세포 활성 조절용 조성물.
- [청구항 14] 제1항에 있어서,
상기 4'-(p-톨루엔설폰아미노)-4-하이드록시칼콘 또는 이의 약학적으로

허용가능한 염은 자연 살상 세포에서 CD112R (CD112 receptor), TIGIT (T cell immunoglobulin and ITIM domain), CD96 (Tactile, T cell activation, increased late expression), PD-1(programmed cell death protein-1)의 발현을 억제시키는 것을 특징으로 하는, 자연 살상 세포 활성화 조절용 조성물.

[청구항 15] 4'-(p-톨루엔설폰아미노)-4-하이드록시칼콘 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 자연 살상 세포(Natural killer cell, NK cell) 활성화 조절 방법.

[청구항 16] 자연 살상 세포(Natural killer cell, NK cell) 활성화 조절에 사용하기 위한 4'-(p-톨루엔설폰아미노)-4-하이드록시칼콘 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 용도.

청구범위 보정서

국제사무국 접수일: 2022 년 4 월 14 일 (14.04.2022)

【청구의 범위】

【청구항 1】

4'-(p-톨루엔설퍼닐아미노)-4-하이드록시칼콘 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로
5 포함하는 자연 살상 세포(Natural killer cell, NK cell) 활성화 조절용 조성물.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서,

상기 4'-(p-톨루엔설퍼닐아미노)-4-하이드록시칼콘 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 간의
손상, 면역세포의 밀집 또는 염증을 억제하는 것을 특징으로 하는, 자연 살상 세포 활성화 조절용
10 조성물.

【청구항 3】

제 1 항에 있어서,

상기 4'-(p-톨루엔설퍼닐아미노)-4-하이드록시칼콘 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은
간조직에서의 면역세포의 밀집 정도, Ki67 또는 AFP(Alpha-fetoprotein) 단백질의 발현 정도, 또는
15 육아종염증의 형성을 감소시키는 것을 특징으로 하는, 자연 살상 세포 활성화 조절용 조성물.

【청구항 4】

제 1 항에 있어서,

상기 4'-(p-톨루엔설퍼닐아미노)-4-하이드록시칼콘 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은
간조직에서의 TM4SF5 또는 콜라겐 (collagen), 라미닌(Laminin), 라미닌 $\gamma 2$ (Laminin $\gamma 2$)의 발현을
20 억제하거나, STAT3(Signal transducer and activator of transcription 3)의 Tyrosine 705 또는
ERK1/2 의 인산화의 증가를 억제하는 것을 특징으로 하는, 자연 살상 세포 활성화 조절용 조성물.

【청구항 5】

제 1 항에 있어서,

상기 4'-(p-톨루엔설퍼닐아미노)-4-하이드록시칼콘 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 분리된
25 시료 내 ALT(Alanine aminotransferase), 콜레스테롤(Cholesterol) 또는 글루코스(Glucose) 수치를
낮추는 것을 특징으로 하는, 자연 살상 세포 활성화 조절용 조성물.

【청구항 6】

제 5 항에 있어서,

상기 분리된 시료는 혈액, 전혈, 혈청 및 혈장으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인
30 것을 특징으로 하는, 자연 살상 세포 활성화 조절용 조성물.

보정용지 (조약 제19조)

【청구항 7】

제 1 항에 있어서,

- 상기 4'-(p-톨루엔설퍼닐아미노)-4-하이드록시칼콘 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 비장 내
5 자연 살상 세포의 군집을 증가 또는 간 조직내의 살상 세포를 활성화시키는 것 혹은 CD4(cluster of differentiation 4)+ 양성 보조 T 세포의 군집을 증가시키는 것을 특징으로 하는, 자연 살상 세포 활성 조절용 조성물.

【청구항 8】

제 1 항에 있어서,

- 10 상기 4'-(p-톨루엔설퍼닐아미노)-4-하이드록시칼콘 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 간에서 종양의 형성, 종양의 숫자, 종양의 부피 및 최대 종양의 크기로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 감소시키는 것을 특징으로 하는, 자연 살상 세포 활성 조절용 조성물.

【청구항 9】

제 1 항에 있어서,

- 15 상기 4'-(p-톨루엔설퍼닐아미노)-4-하이드록시칼콘 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 표적 세포에서 MICA(MHC class I polypeptide-related sequence A), MICB(MHC class I polypeptide-related sequence B), CADM1(Cell adhesion molecule 1), SLAMF6(SLAM family member 6), SLAMF7(SLAM family member 7), ULBP1(UL16-binding protein 1), ULBP2(UL16-binding protein 2), ULBP3(UL16-binding protein 3), Nectin-1(Nectin Cell Adhesion Molecule 1) 및 Nectin-2(Nectin Cell Adhesion Molecule
20 2) 로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는, 자연 살상 세포 활성 조절용 조성물.

【청구항 10】

제 9 항에 있어서,

- 상기 표적 세포는 손상된 간 세포, 조직, 또는 간암세포인 것을 특징으로 하는, 자연 살상 세포
25 활성 조절용 조성물.

【청구항 11】

제 1 항에 있어서,

상기 4'-(p-톨루엔설퍼닐아미노)-4-하이드록시칼콘 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 자연 살상 세포에서 NKG2D(natural killer receptor group 2 member D), SLAMF6 또는 SLAMF7 로 이루어진

군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는, 자연 살상 세포 활성 조절용 조성물.

【청구항 12】

- 5 제 1 항에 있어서,
 상기 4'-(p-톨루엔설폰아미노)-4-하이드록시칼콘 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 자연 살상 세포에서 PRF1(Perforin), GZMB(Granzyme B), CD107a(Cluster of Differentiation 107a, 혹은 lysosomal-associated membrane protein 1, LAMP1), TNF- α (Tumor necrosis factor- α), FasL(Fas ligand) 및 TRAIL(TNF-related apoptosis-inducing ligand)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나
 10 이상의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는, 자연 살상 세포 활성 조절용 조성물.

【청구항 13】

- 제 1 항에 있어서,
 상기 4'-(p-톨루엔설폰아미노)-4-하이드록시칼콘 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 간상피세포에서 CD112 [Nectin-2, Poliovirus receptor-related 2 (PVRL2)], CD111 [Nectin-1,
 15 Poliovirus receptor-related 1 (PVRL1)], PD-L1(programmed death-ligand 1)의 발현을 억제시키는 것을 특징으로 하는, 자연 살상 세포 활성 조절용 조성물.

【청구항 14】

- 제 1 항에 있어서,
 상기 4'-(p-톨루엔설폰아미노)-4-하이드록시칼콘 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 자연
 20 살상 세포에서 CD112R (CD112 receptor), TIGIT (T cell immunoglobulin and ITIM domain), CD96 (Tactile, T cell activation, increased late expression), PD-1(programmed cell death protein-1)의 발현을 억제시키는 것을 특징으로 하는, 자연 살상 세포 활성 조절용 조성물.

【청구항 15】

- 4'-(p-톨루엔설폰아미노)-4-하이드록시칼콘 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 개체에
 25 투여하는 단계를 포함하는 자연 살상 세포(Natural killer cell, NK cell) 활성 조절 방법.

【청구항 16】

자연 살상 세포(Natural killer cell, NK cell) 활성 조절에 사용하기 위한
 4'-(p-톨루엔설폰아미노)-4-하이드록시칼콘 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 용도.

조약 제19조(1) 규정의 설명서

1. 경과

본 건은 2021년 12월 3일에 PCT 출원된 (PCT 출원번호 PCT/KR2021/018197), " TSAHC 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 자연 살상 세포 활성 조절용 조성물 "에 관한 것으로, 상기 출원에 대해 2022년 4월 14일 PCT 조약 19조에 의한 보정서를 제출하는 바, 하기는 PCT 조약 19조에 의한 보정서에 대한 설명서(특허청구범위의 보정 전후의 차이점 설명서 및 보정의 타당성 설명서)입니다.

2. 특허청구범위의 보정

1) 특허청구범위의 보정 전후 차이점

청구항 제10항은 청구항 8의 "표적 세포"를 인용하고 있으나, 상기 표적 세포는 청구항 8에 기재되어 있지 않고, 청구항 9에 기재되어 있으므로, 인용하는 항을 명확하게 하기 위하여 8항에서 9항으로 보정하였습니다.

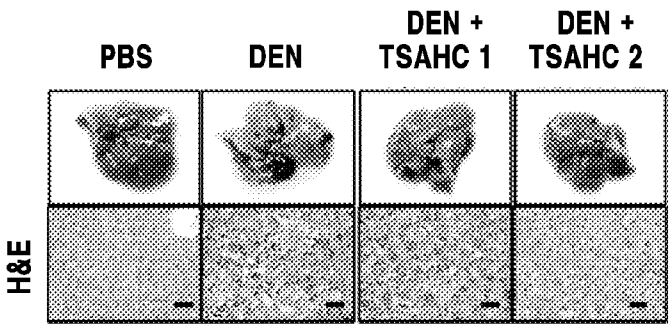
청구항	보정 전	보정 후
청구항 10	제8항에 있어서, 상기 표적 세포는 손상된 간 세포, 조직, 또는 간암세포인 것을 특징으로 하는, 자연 살상 세포 활성 조절용 조성물	제9항에 있어서, 상기 표적 세포는 손상된 간 세포, 조직, 또는 간암세포인 것을 특징으로 하는, 자연 살상 세포 활성 조절용 조성물

2) 특허청구범위의 보정에 대한 타당성

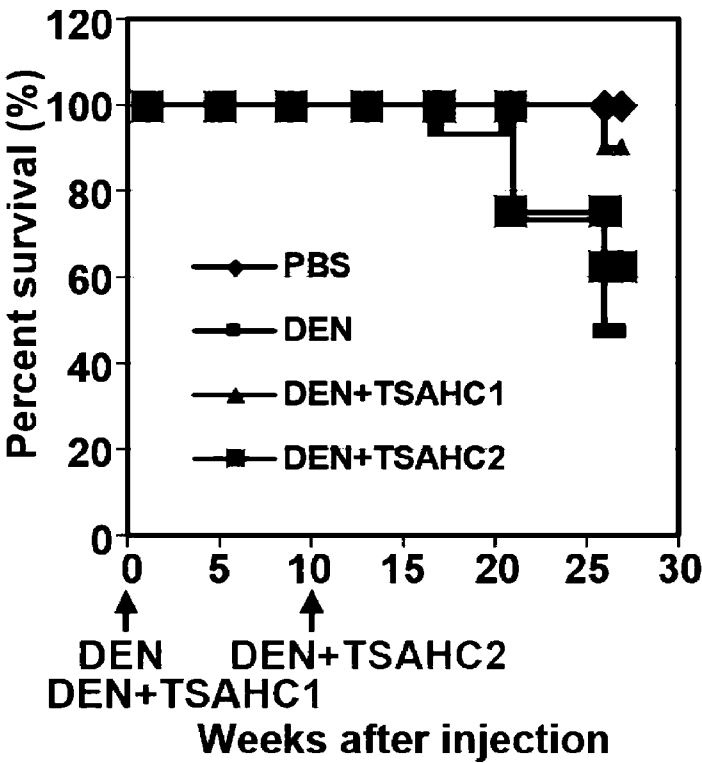
청구항 제10항은 발명의 내용을 명확하게 하기 위하여, 인용하는 항을 보정하였습니다.

따라서, 상기 특허청구범위의 보정은 최초 출원 명세서에서 실제적인 내용에는 어떠한 변경도 수행되지 않는 것입니다.

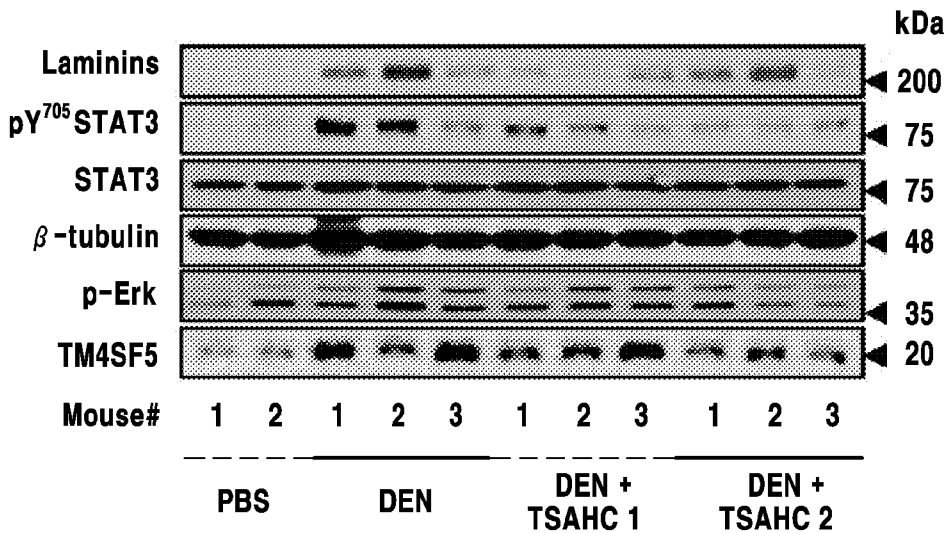
[도1]



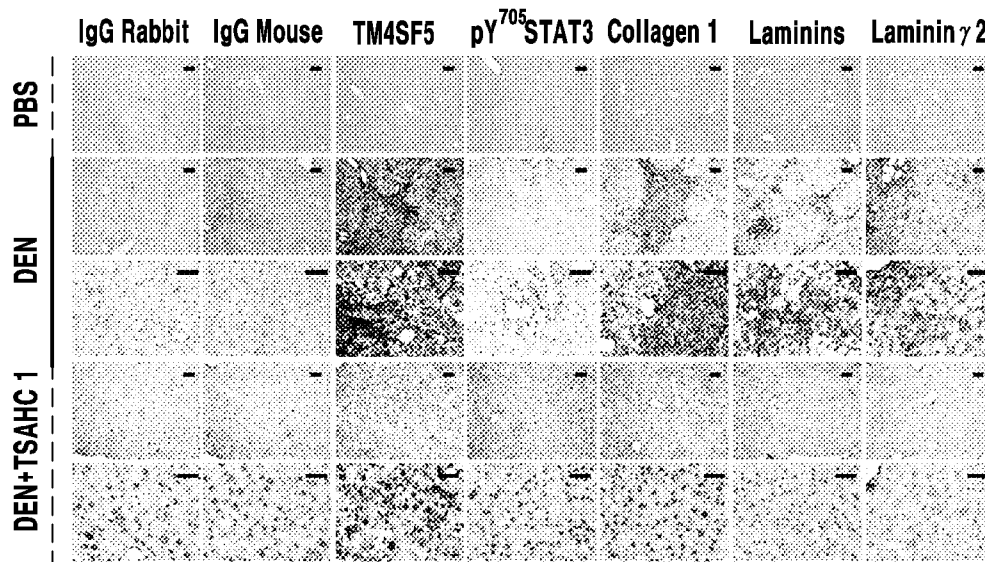
[도2]



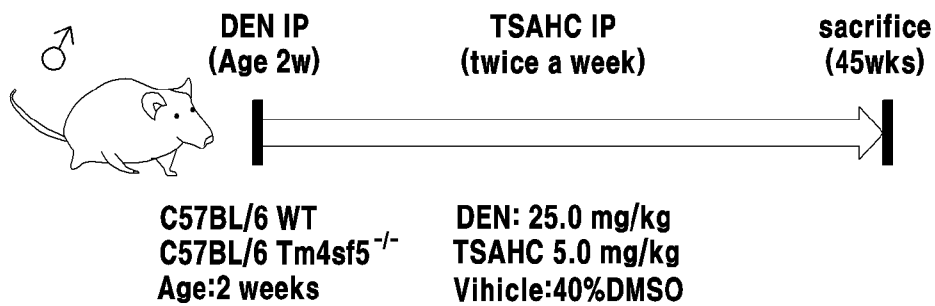
[도3]



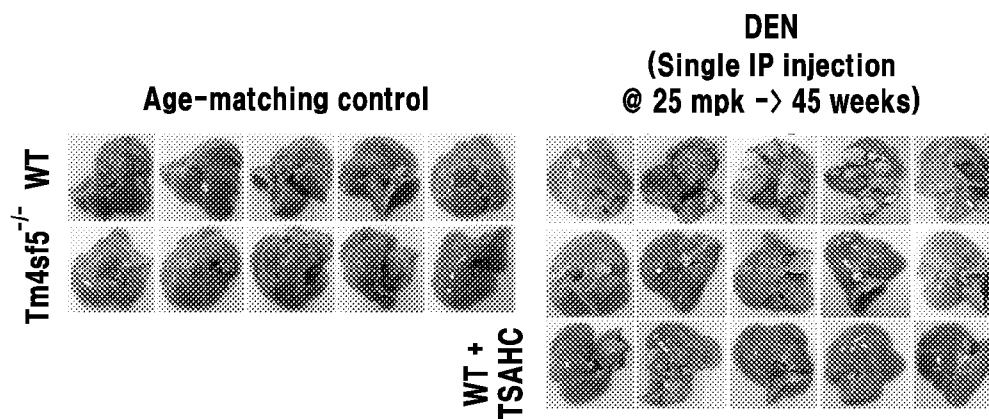
[도4]



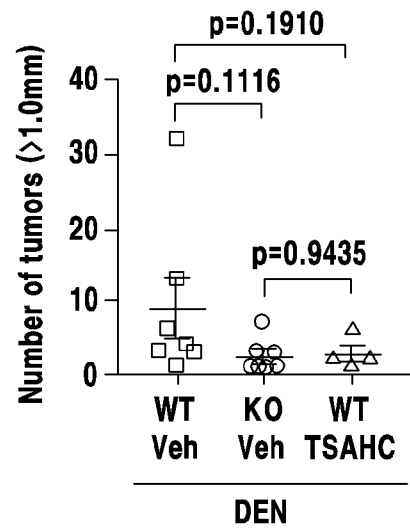
[도5]



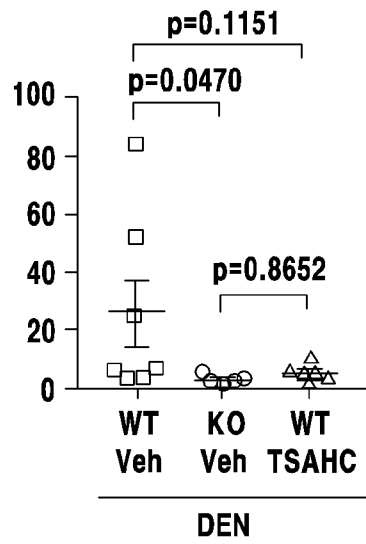
[도6]



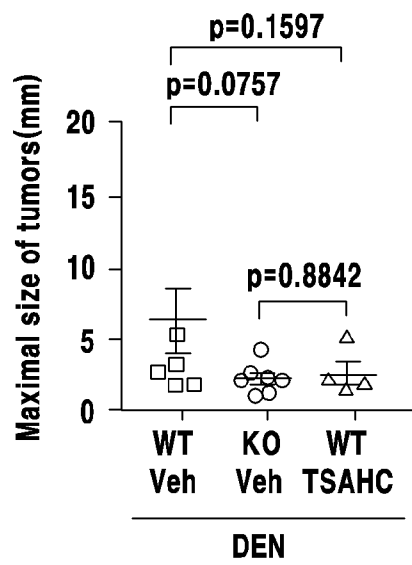
[도7a]



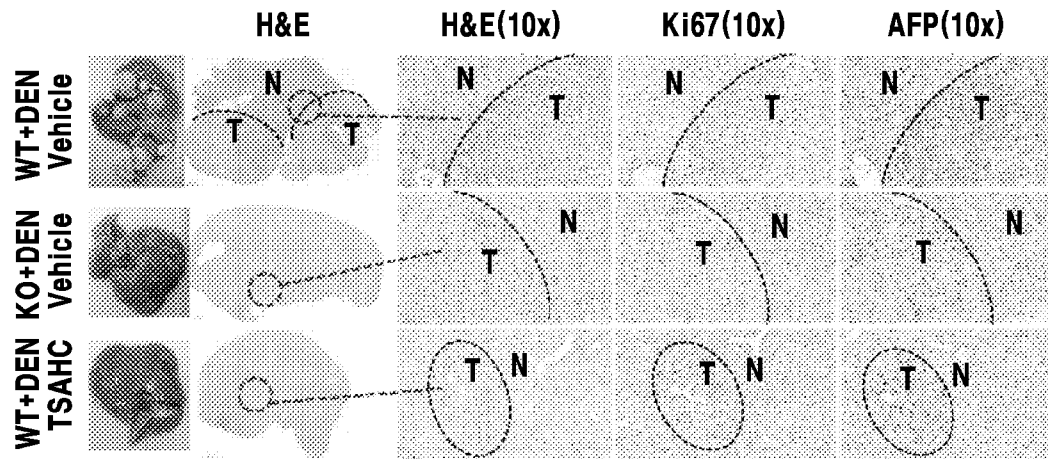
[도7b]



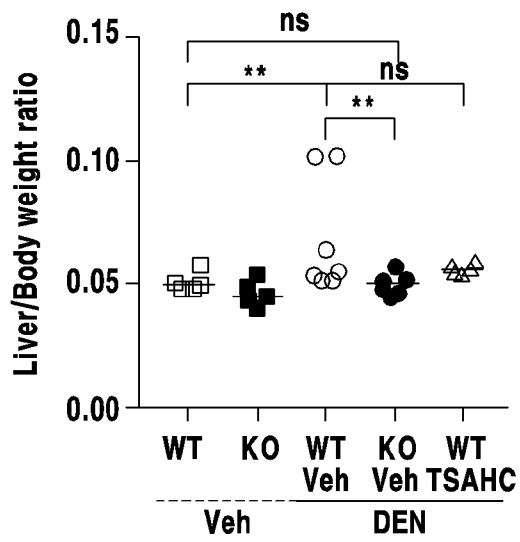
[도7c]



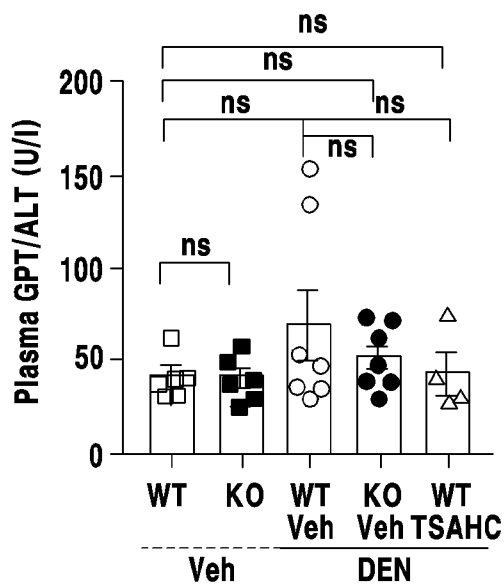
[도8]



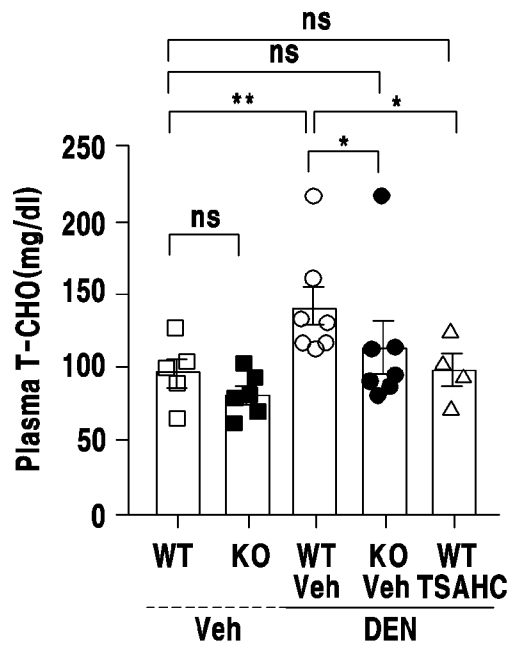
[도9a]



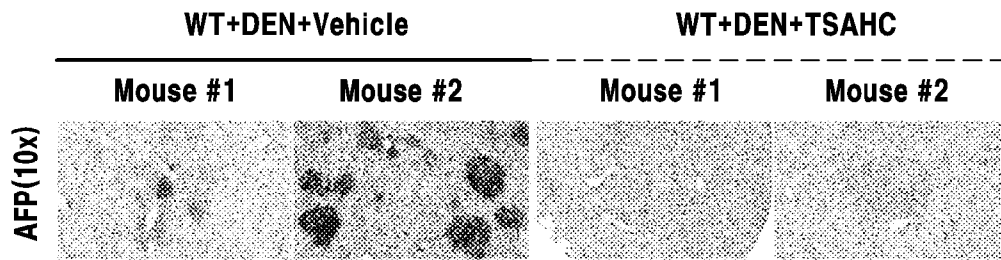
[도9b]



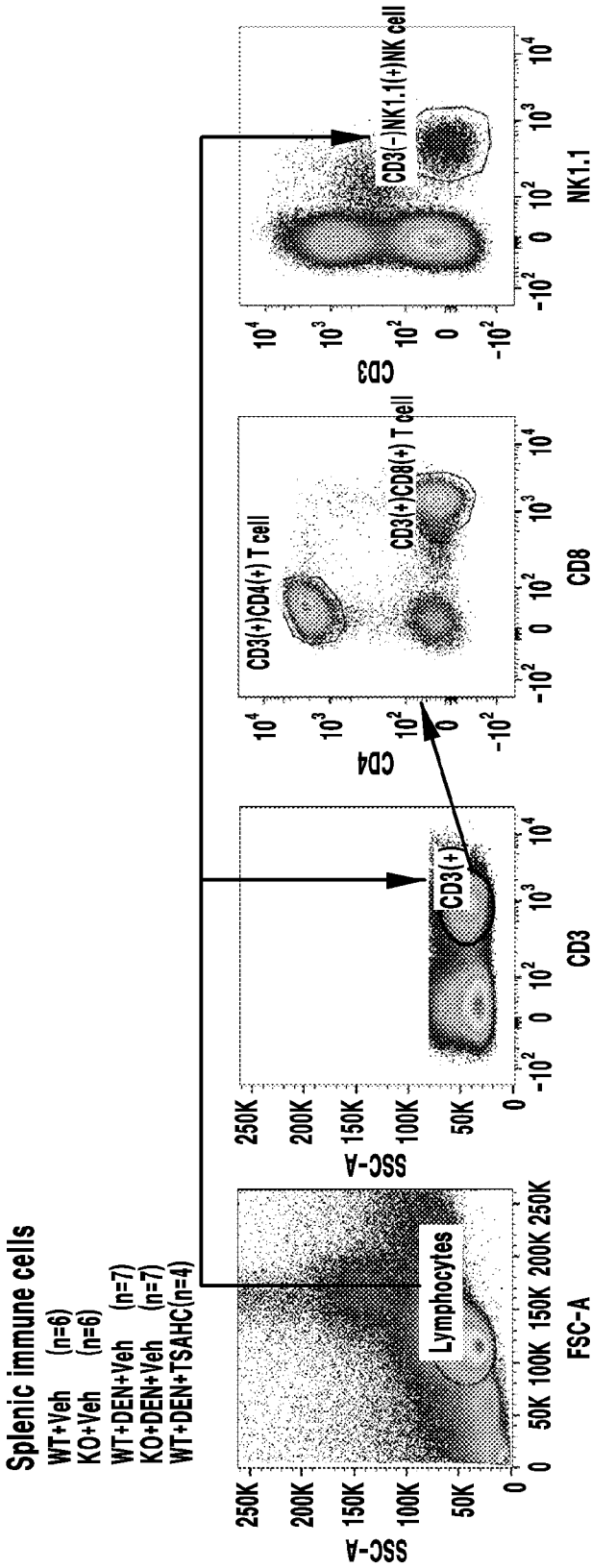
[도9c]



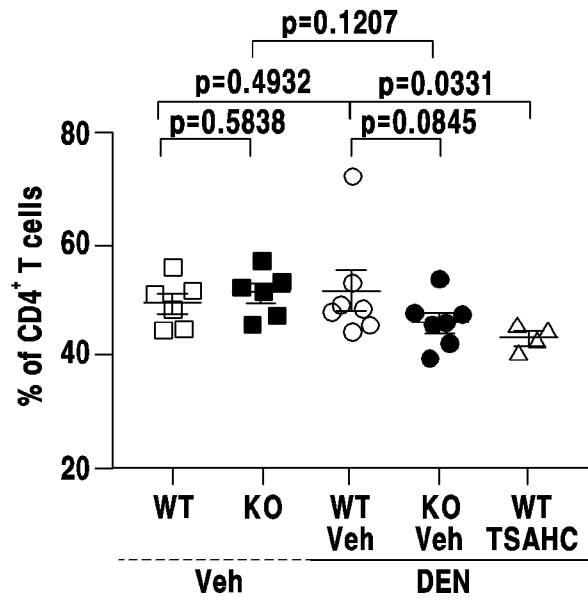
[도10]



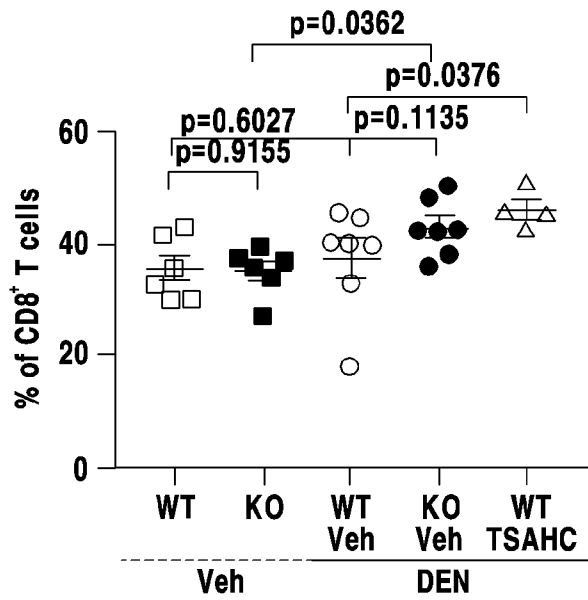
[도11a]



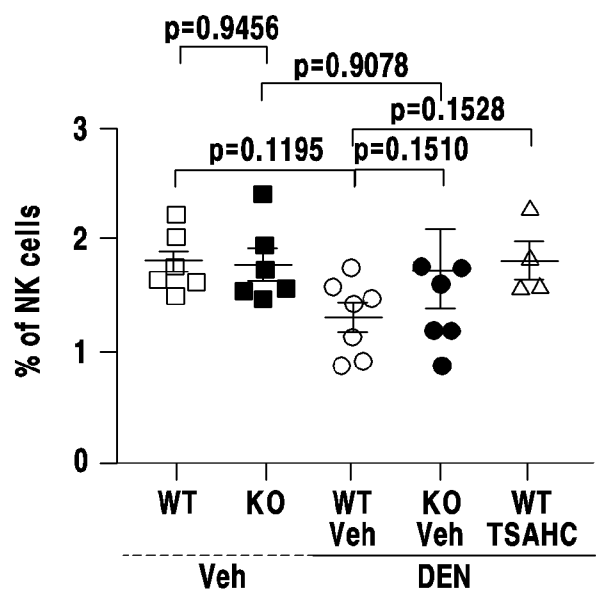
[도11b]



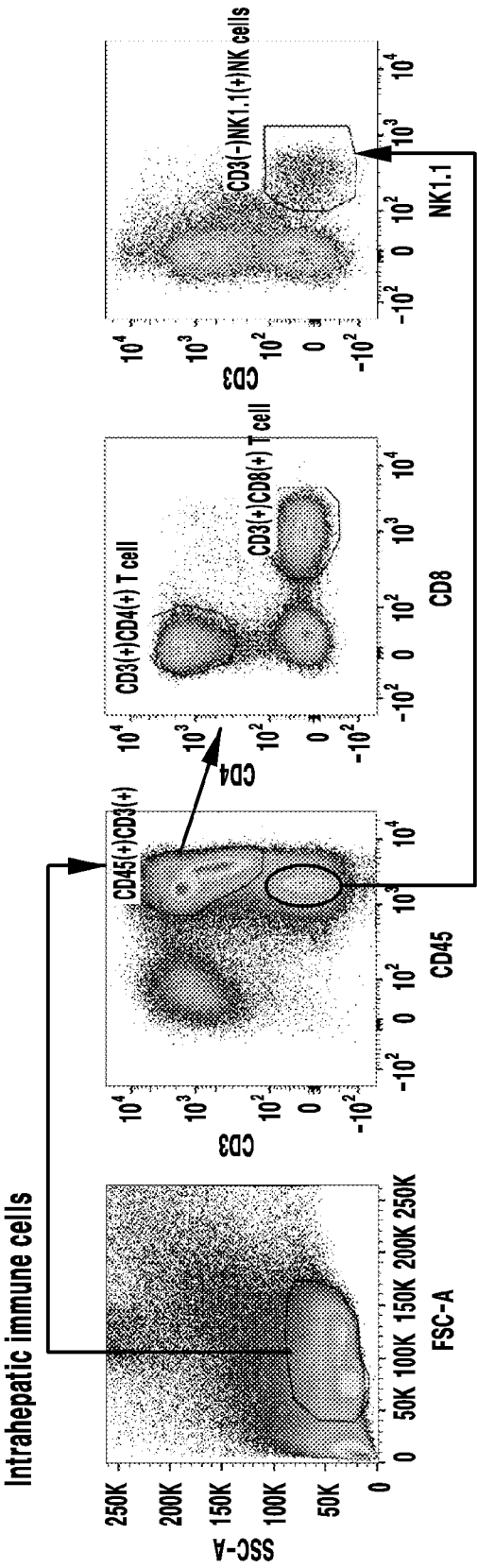
[도11c]



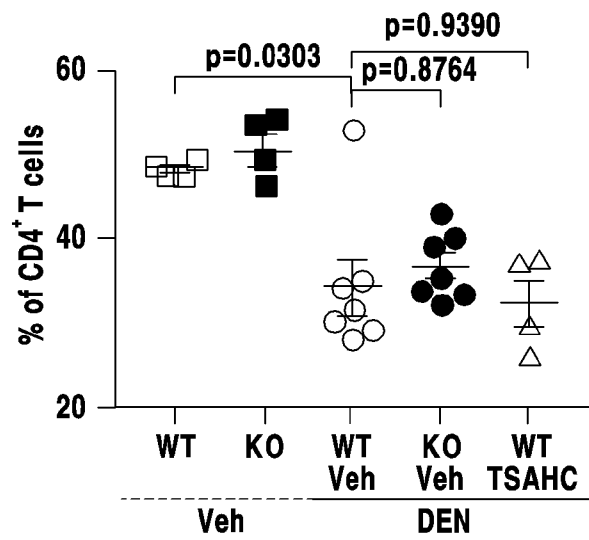
[도11d]



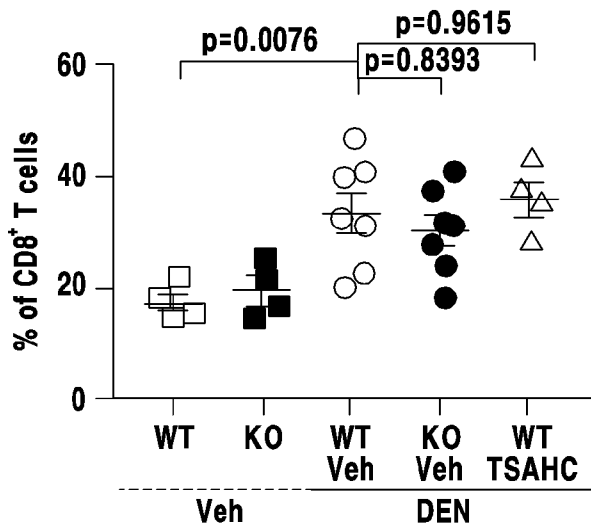
[도 12a]



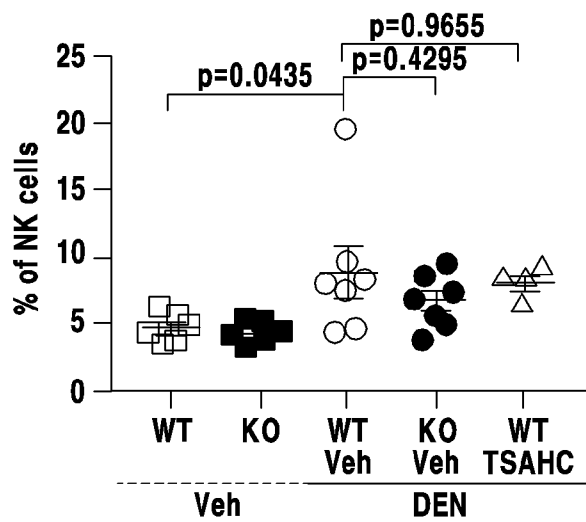
[도12b]



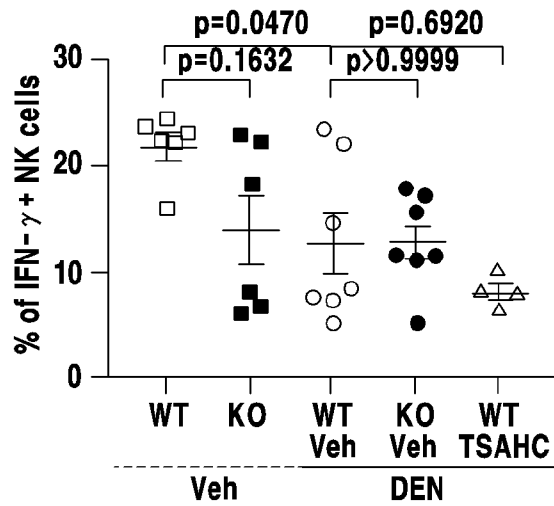
[도12c]



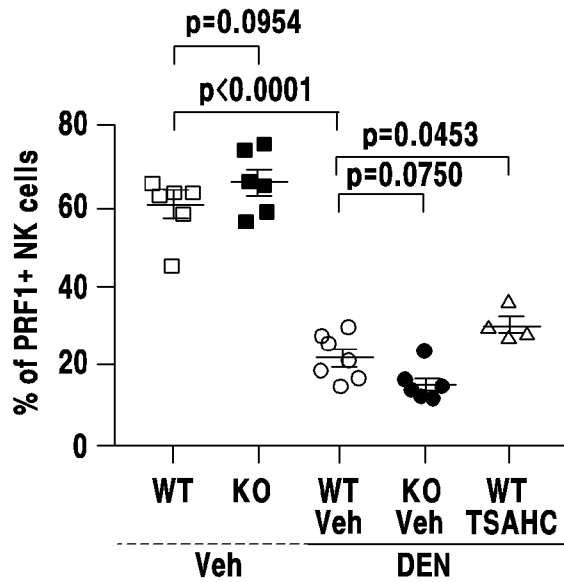
[도12d]



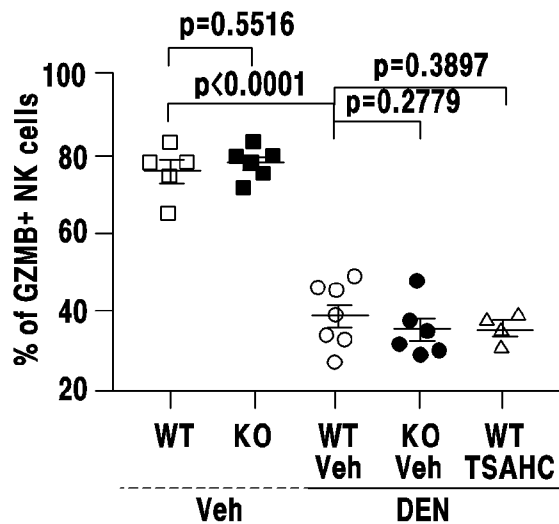
[도 13a]



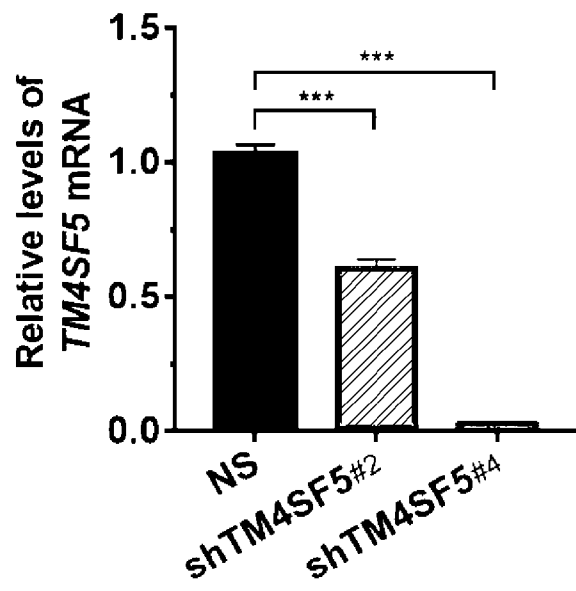
[도 13b]



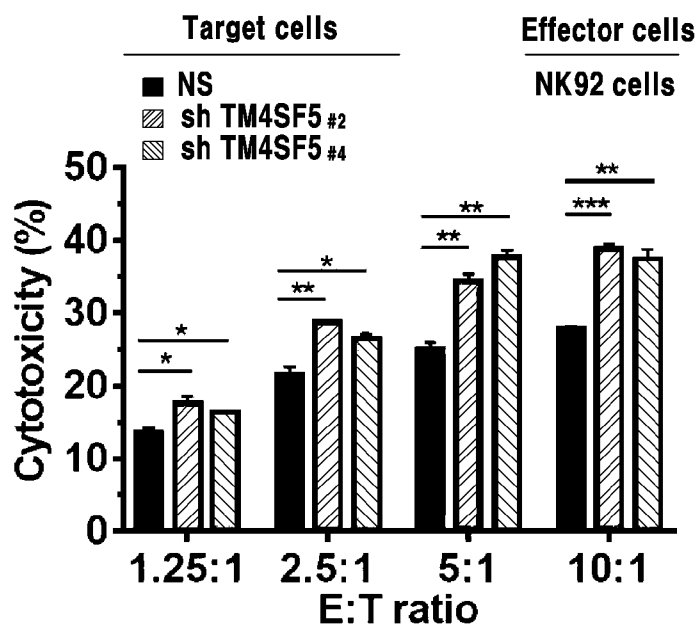
[도 13c]



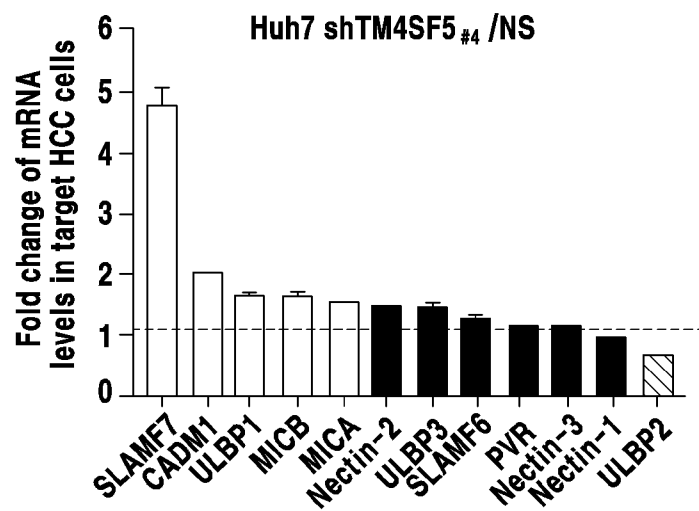
[도 14a]



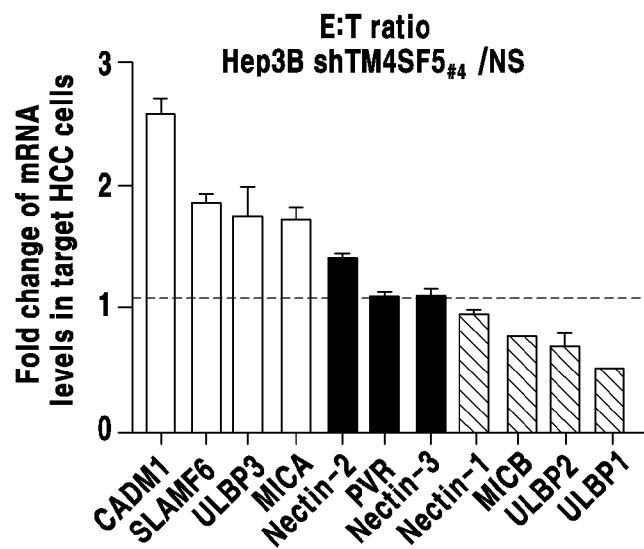
[도 14b]



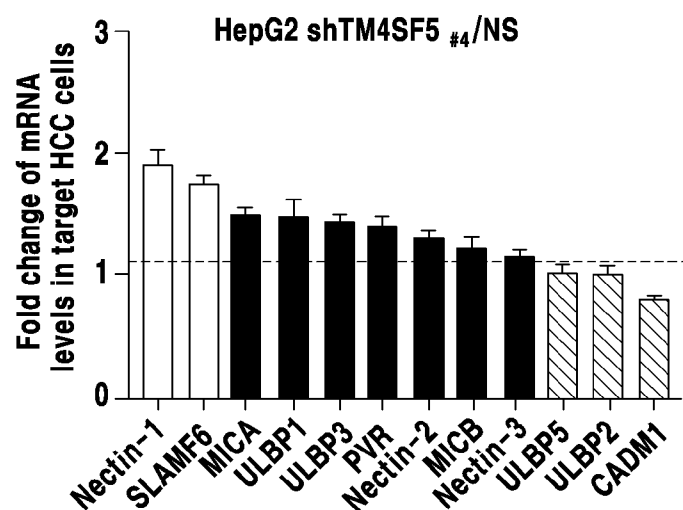
[도 15a]



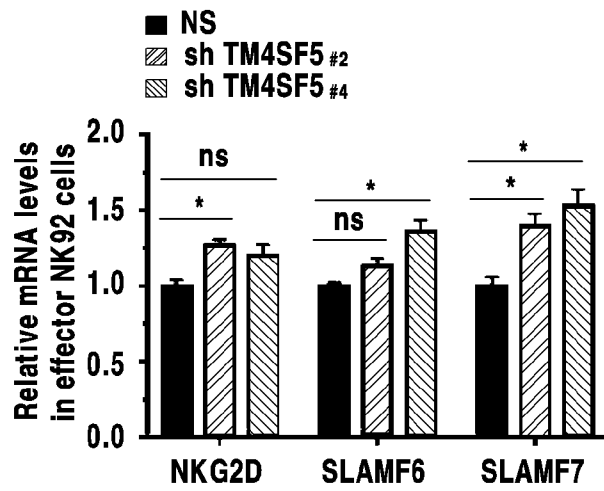
[도 15b]



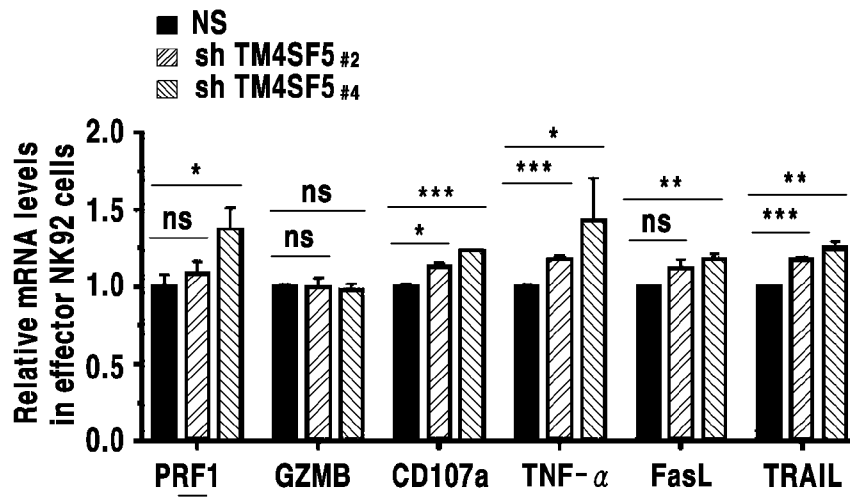
[도 15c]



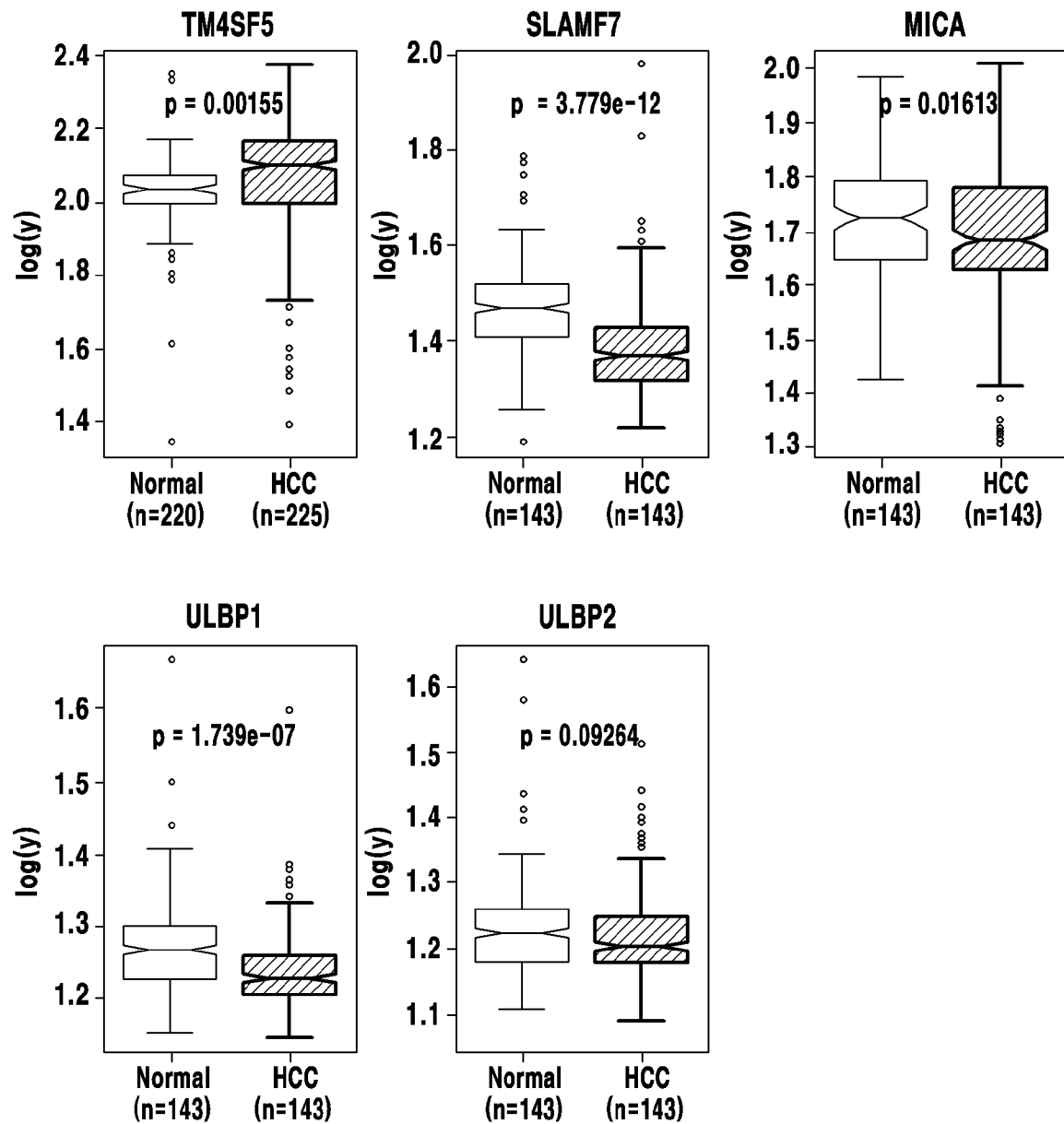
[도16a]



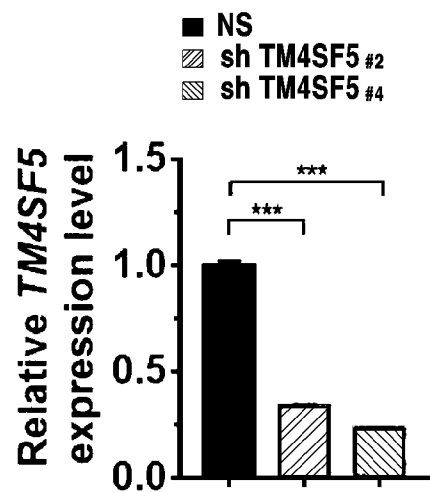
[도16b]



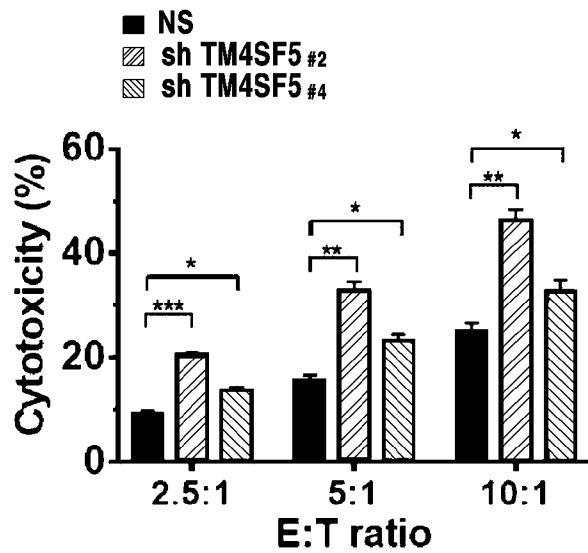
[도17]



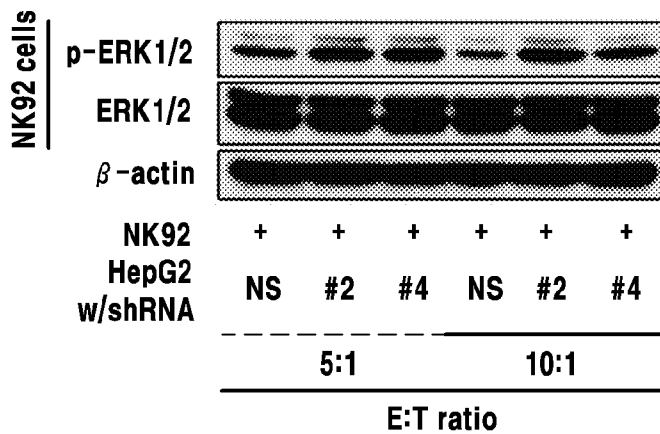
[도18a]



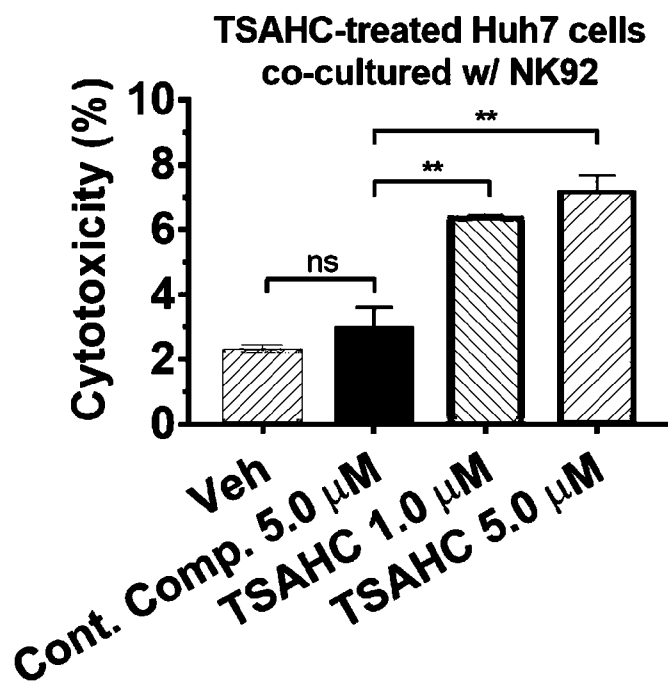
[도18b]



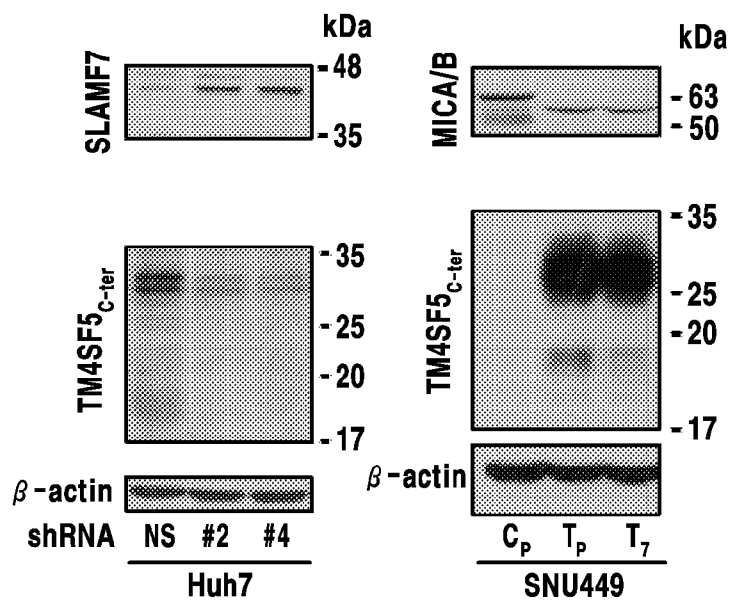
[도19]



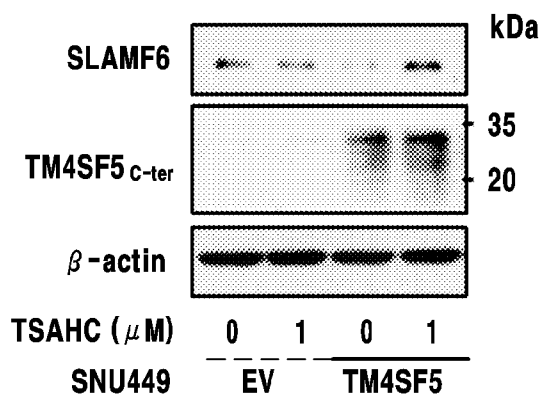
[도20]



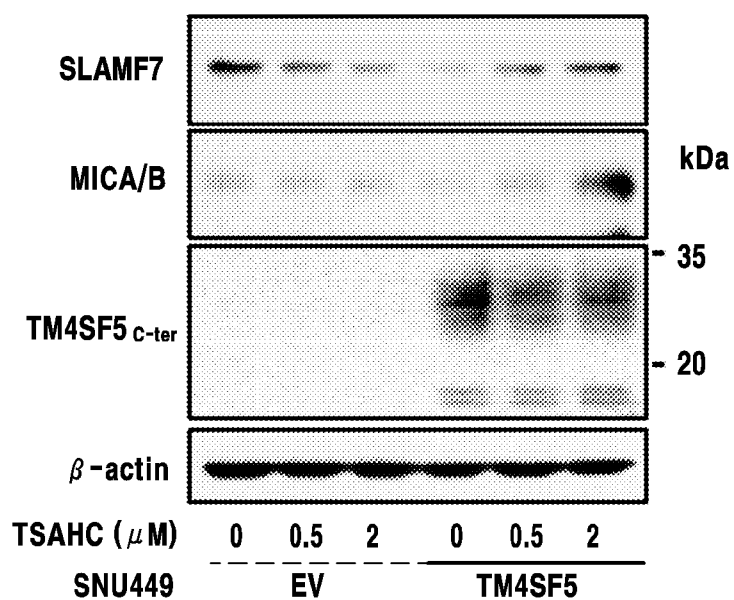
[도21]



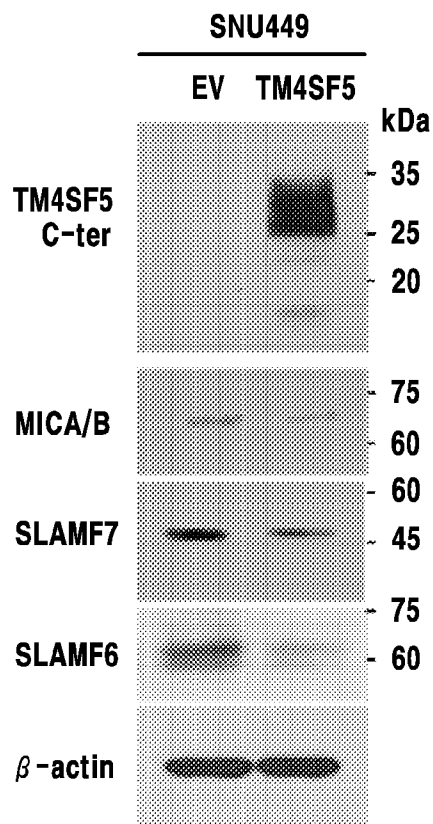
[도22a]



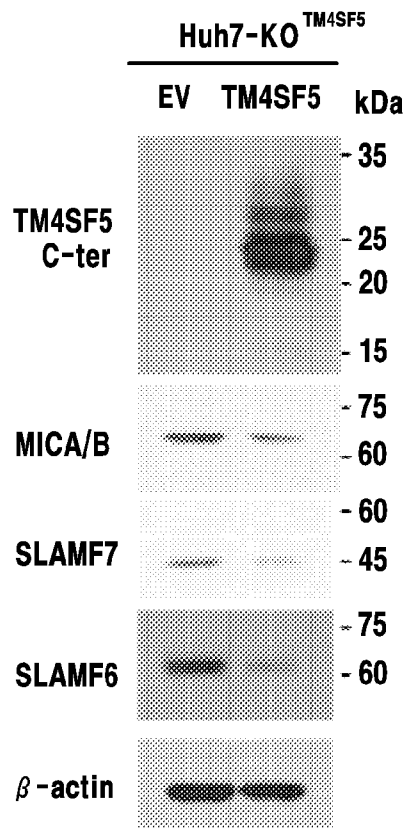
[도22b]



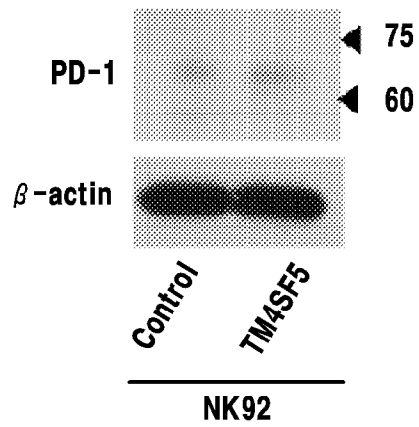
[도23a]



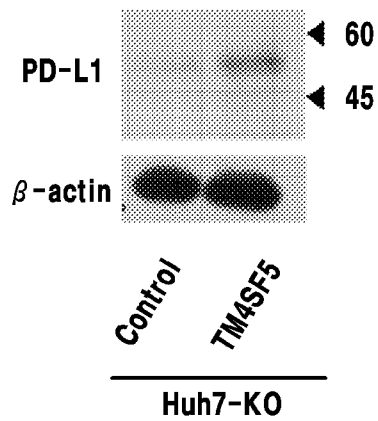
[도23b]



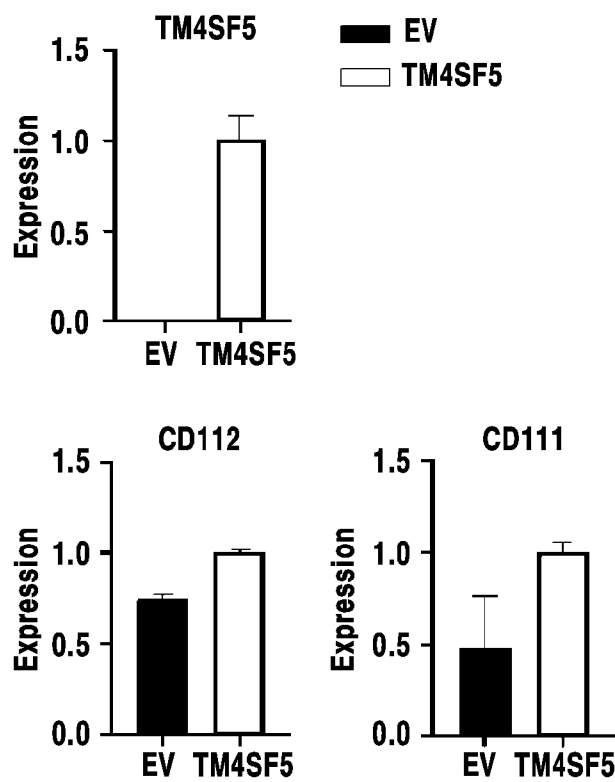
[도24a]



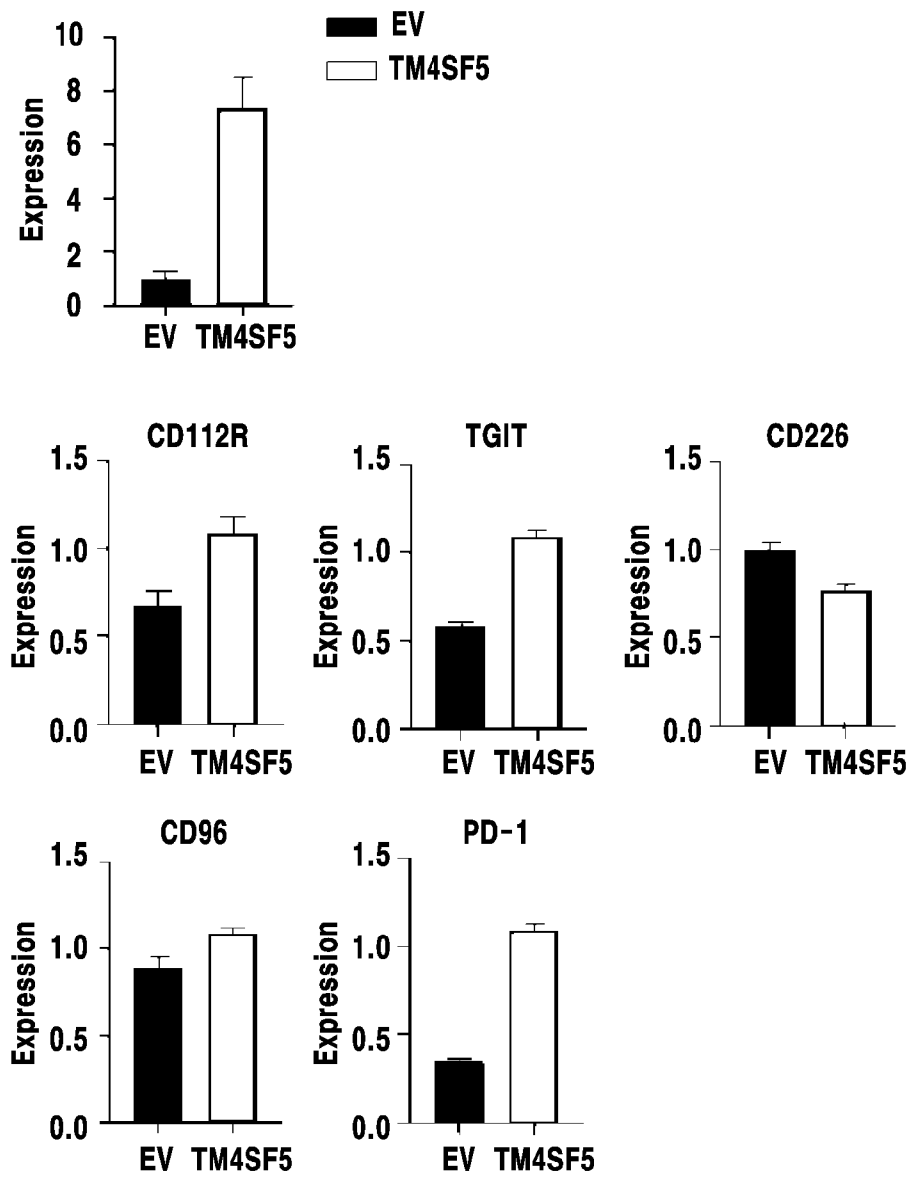
[도24b]



[도25a]



[도25b]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/018197

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/18(2006.01)i; A61P 1/16(2006.01)i; A61P 37/00(2006.01)i; A61P 35/00(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 31/18(2006.01); G01N 33/53(2006.01); G01N 33/576(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: 4'-(p-톨루엔설포닐아미노)-4-하이드록시칼콘(4'-(p-toluenesulfonylamido)-4-hydroxychalcone, TSAHC), 자연 살상 세포(natural killer cell), 활성(activity), TM4SF5

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LEE, J. W. TM4SF5-mediated protein-protein networks and tumorigenic roles. BMB Reports. 2014, vol. 47, no. 9, pp. 483-487. See entire document.	1-14,16
A	JUNG, J. W. et al. Transmembrane 4 L six family member 5 senses arginine for mTORC1 signaling. Cell Metabolism. 2019, vol. 29, pp.1306-1319. See entire document.	1-14,16
A	AHN, H.-M. et al. Anti-cancer activity of novel TM4SF5-targeting antibodies through TM4SF5 neutralization and immune cell-mediated cytotoxicity. Theranostics. 11 January 2017, vol. 7, no. 3, pp. 594-613. See entire document.	1-14,16
A	LEE, B. et al. In vitro characterization of 4'-(p-toluenesulfonylamide)-4-hydroxychalcone using human liver microsomes and recombinant cytochrome P450s. Xenobiotica. (electronic publication) 02 September 2015, vol. 46, pp. 350-356 (early online version; pp. 1-7). See entire document.	1-14,16



Further documents are listed in the continuation of Box C.



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

08 March 2022

Date of mailing of the international search report

08 March 2022

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/KR2021/018197**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2012-0022504 A (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) 12 March 2012 (2012-03-12) See entire document.	1-14, 16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/018197

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/018197

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.: **15**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 15 pertains to a method for treatment of the human body by therapy, and thus pertains to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of 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/KR2021/018197

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-2012-0022504 A	12 March 2012	KR 10-1368871 B1	28 February 2014
		KR 20120023524 A	13 March 2012
		US 2013-0178533 A1	11 July 2013
		US 9057725 B2	16 June 2015
		WO 2012-015200 A2	02 February 2012
		WO 2012-015200 A3	27 September 2012

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 31/18(2006.01)i; A61P 1/16(2006.01)i; A61P 37/00(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 31/18(2006.01); G01N 33/53(2006.01); G01N 33/576(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: 4'-(p-톨루엔설포닐아미노)-4-하이드록시칼콘(4'-(p-toluenesulfonylamido)-4-hydroxychalcone, TSAHC), 자연 살상 세포(natural killer cell), 활성(activity), TM4SF5		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	LEE, J. W., 'TM4SF5-mediated protein-protein networks and tumorigenic roles', BMB Reports, 2014, 47권, 9호, 483-487 페이지 전체 문헌	1-14,16
A	JUNG, J. W. 등, 'Transmembrane 4 L six family member 5 senses arginine for mTORC1 signaling', Cell Metabolism, 2019, 29권, 1306-1319 페이지 전체 문헌	1-14,16
A	AHN, H.-M. 등, 'Anti-cancer activity of novel TM4SF5-targeting antibodies through TM4SF5 neutralization and immune cell-mediated cytotoxicity', Theranostics, 2017.01.11, 7권, 3호, 594-613 페이지 전체 문헌	1-14,16
A	LEE, B. 등, 'In vitro characterization of 4'-(p-toluenesulfonylamide)-4-hydroxychalcone using human liver microsomes and recombinant cytochrome P450s', Xenobiotica, (전자공개)2015.09.02, 46권, 350-356 페이지(early online version; 1-7 페이지) 전체 문헌	1-14,16
A	KR 10-2012-0022504 A (서울대학교산학협력단) 2012.03.12 전체 문헌	1-14,16
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 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 2022년03월08일(08.03.2022)		국제조사보고서 발송일 2022년03월08일(08.03.2022)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

- a. ☒ 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - ☒ 부록 C/ST.25 텍스트 파일
 - ☐ 서면 혹은 이미지 파일
- b. ☐ PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록
- c. ☐ 국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록
 - ☐ 부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))
 - ☐ 서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713).

2. ☐ 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

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: **15**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 15는 치료에 의한 사람의 처치방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 조약규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
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 10-2012-0022504 A	2012/03/12	KR 10-1368871 B1	2014/02/28
		KR 20120023524 A	2012/03/13
		US 2013-0178533 A1	2013/07/11
		US 9057725 B2	2015/06/16
		WO 2012-015200 A2	2012/02/02
		WO 2012-015200 A3	2012/09/27