

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.

C12N 5/06 (2006.01)

C12N 5/08 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2006-0110696

(43) 공개일자 2006년10월25일

(21) 출원번호 10-2005-0033189

(22) 출원일자 2005년04월21일

(71) 출원인 고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자 박용근
서울시 도봉구 도봉동 한신아파트 122동 1304호
윤원석
서울시 노원구 공릉1동 590-1 현대아파트 101동 202호

(74) 대리인 손민

심사청구 : 있음

(54) C D 4 T 세포 활성화 방법

요약

본 발명은 CD4 T 세포를 분리하여 GM-CSF, IFN- γ , TNF- α , Lectin 및 IL-4를 포함하는 사이토카인을 첨가한 배지에서 배양하여 시험관내에서 CD4 T 세포를 활성화시키는 방법 및 상기 방법으로 활성화된 CD4 T 세포를 포함하는 박테리아 감염 질환을 예방 또는 치료하는 조성물에 관한 것이다.

대표도

도 2

색인어

CD4 T cell, GM-CSF, IFN- γ , TNF- α , Lectin, IL-4, 세포 치료

명세서

도면의 간단한 설명

도1은 개체로부터 CD4 T Cell 을 분리하여 활성화시키는 과정을 나타낸 모식도이다.

도 2는 살모넬라 감염증이 유발된 마우스에 대하여 다양한 세포를 투여하여 그 효과를 비교한 결과이다.

도 3은 활성화된 CD4 T 세포를 투여하여 생존한 마우스에 대하여 살모넬라를 감염시킨 후 백신효과가 나타나는지를 검증한 결과이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 CD4 T 세포를 분리하여 GM-CSF, IFN-gamma, TNF-alpha, Lectin 및 IL-4를 포함하는 사이토카인을 첨가한 배지에서 배양하여 시험관내에서 CD4 T 세포를 활성화시키는 방법 및 상기 방법으로 활성화된 CD4 T 세포를 포함하는 박테리아 감염 질환을 예방 또는 치료하는 조성물에 관한 것이다.

살모넬라(*Salmonella typhimurium*)은 사람에게 설사와 장염을 일으키며 돼지를 비롯한 가축의 창자 속 내용물에서 흔히 발견되는 식중독의 원인균이다. 사람의 경우 오염된 물이나 감염된 가축의 분변에 오염된 음식을 먹었을 경우 식중독에 걸리게 된다. 살모넬라균의 경우, 페니실린 계열의 항생제로 치료하였다.

하지만 생물테러용으로 제조되는 재조합 변형 살모넬라균과 최근 독일에서 발견된 항생제 내성 살모넬라균의 경우, 기존의 항생제로서는 치료가 불가능하며 이에 따른 피해가 우려되나 마땅한 대체치료 기술이 부재한 실정이다.

새로운 치료제의 한 분야로서 면역세포 등을 세포치료제로 이용하는 방법이 연구되고 있으며, 이러한 치료법은 특정 개체에서 분리한 면역세포를 활성화시켜 환자에게 직접 투여한다. 이러한 세포치료법에서는 APC 세포, 특정 항원 등으로 활성화시킨 세포를 이용하였다.

이러한 배경 하에서, 본 발명자는 GM-CSF, IFN-gamma, TNF-alpha, Lectin 및 IL-4의 배합물이 CD4 T 세포를 상승적으로 활성화시켜 이렇게 활성화된 CD4 T 세포가 박테리아 감염을 효과적으로 치료하고 또한 재감염에 대한 예방 효과를 가진다는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 하나의 목적은 개체의 생물학적 시료로부터 CD4 T 세포를 분리하는 단계; 및 상기 CD4 T 세포를 GM-CSF, IFN-gamma, TNF-alpha, Lectin 및 IL-4를 포함하는 사이토카인을 첨가한 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 시험관내에서 CD4 T 세포를 활성화시키는 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 상기의 방법으로 활성화된 CD4 T 세포를 포함하는 박테리아 감염 질환을 예방 또는 치료하는 조성물을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

하나의 양태로서, 본 발명은 개체의 생물학적 시료로부터 CD4 T 세포를 분리하는 단계; 및 상기 CD4 T 세포를 GM-CSF, IFN-gamma, TNF-alpha, Lectin 및 IL-4를 포함하는 사이토카인을 첨가한 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 시험관내에서 CD4 T 세포를 활성화시키는 방법을 제공하는 것이다.

T 세포는 면역 반응에 관여하는 세포로, 특정 세포 표면 마커(cell surface marker)를 발현하는 T 세포 집단(population)을 의미한다. 본 발명은 T 세포 집단 중에서 CD4 표면 마커를 가지는 T 세포만을 분리하여 사용하고자 한다. CD4 항원을 가지는 CD4 T 세포에는 TH 세포(helper T 세포)가 있다. TH 세포는 세포성 및 체액성 면역반응을 활성화시킨다. 또한, CD4 항원을 가지는 CD4 T 세포에는 TD 세포(delayed type hypersensitivity T 세포)가 있다.

본 발명에서 용어, “개체(subject)”란 T 세포를 포함하는 단핵세포를 제공하는 제공자(donor)로, 혈관계(vascular system) 및 조혈세포(hematopoietic cell)를 가지는 유기체가 모두 포함될 수 있으며, 바람직하게는 인간과 소, 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개, 마우스 등의 척추동물이다.

T 세포, 보다 구체적으로 CD4 T 세포는 개체의 단핵세포(mononuclear cell)를 포함하는 다양한 생물학적 시료, 예를 들면 혈액(blood), 혈장(plasma), 림프구(lymph node), 비장(spleen), 흉선(thymus), 골수(bone marrow) 등으로부터 분리될 수 있다.

T 세포를 분리하는 방법은 특별히 제한되지 않는다. 예를 들어, 세포 밀도(cell density), 세포 표면 에피토프에 대한 항체 친화도, 세포 크기(cell size), 형광 방출(fluorescent emission) 정도에 의존하여 분리할 수 있다. 구체적으로, 알부민(albumin), 덱스트란(dextran), 피콜(Ficoll), 메트라자미드(metrizamid), 퍼콜(Percoll) 등을 이용하는 밀도 구배 원심분리(density gradient centrifugation) 방법이, 항체를 이용하는 방법으로는 MACS(magnetic activated cell sorter) 등의 방법이, 세포 크기를 이용하는 방법으로는 centrifugal elutriation 등의 방법이, 형광을 이용하는 방법으로는 FACS 등의 방법이 있다. 본 발명에서는 단핵세포에서 CD4 T 세포만을 분리하기 위하여, 항-CD4 T 세포 항체를 사용하여 MACS를 실시하였다.

분리한 CD4 T 세포는 통상의 방법으로 배양되어 시험관내(*in vitro*)에서 활성화된다. 배양에 사용되는 배지는 일반적으로 세포의 성장과 생존에 필수적인 영양소를 함유한다. 상기 배지는 다양한 탄소원, 질소원 및 미량원소 성분을 포함한다. 또한, 바람직하게는 혈청을 포함하는 배지다. 구체적으로 DMEM, RPMI 같은 배지를 사용할 수 있다.

본 발명에서 용어 “T 세포 활성화”란 면역반응을 담당할 수 있도록 자극을 주는 것을 의미하고, 다양한 신호에 의해 활성화될 수 있다. 본 발명의 목적상, T 세포 활성화는 CD T 세포 활성화를 의미한다.

본 발명자는 CD T 세포 활성화에 상기 GM-CSF, IFN- γ , TNF- α , Lectin 및 IL-4 의 배합물이 상승적으로(synergistically) 작용함을 확인하였다. 구체적으로, 살모넬라 티피뮤리움으로 감염될 경우 100% 사망하는 마우스를 살기 한 방법의 사이토카인을 이용하여 활성화된 CD4 T 세포로 처리할 경우, 90%의 생존률을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 CD8 T 세포를 투여하는 경우에는, 오직 20%의 생존률을 보일 뿐이었다. 이런 결과를 통하여 CD4 T 세포가 살모넬라균으로 감염된 질환의 치료에 매우 효과적임을 알 수 있다. 또한, CD4 T 세포 투여에 의하여 생존한 마우스는 살모넬라균 재감염에 대하여 100%의 예방효과를 가지는 것을 통하여, 본 발명의 CD4 T 세포가 우수한 백신 효과를 가지고 있음을 알 수 있다.

배합물에서 각각의 사이토카인 농도는 바람직하게는, 배지 1ml 당, 0.05 내지 0.2 μ g의 GM-CSF, 0.5 내지 2 μ g의 IFN- γ , 0.05 내지 0.2 μ g의 TNF- α , 40 내지 60 μ g의 Lectin 및 0.05 내지 0.2 μ g의 IL-4이다.

상기의 GM-CSF, IFN- γ , TNF- α , Lectin 및 IL-4는 다양한 개체 유래의 야생형이거나, 야생형의 생물학적 활성을 유지하는 이의 단편, 또는 변이체일 수 있다.

상기 사이토카인 배합물은 CD4 T 세포를 활성화시키기 위한 추가의 성분을 포함할 수 있으며, 이런 성분의 예에는 IL-5, IL-10, IL-13 등이 있다.

상기 사이토카인 배합물은 CD4 T 세포를 활성화시키는 유효량 내에서, 이를 세포 배양액에 첨가하는 방법, 시기, 첨가 횟수에 특별히 제한되지 않는다. 분리한 CD4 T 세포를 배양과 동시에 첨가할 수도 있고, 세포 배양 후 일정 시간적 간격을 두고 첨가할 수도 있다. 또한, 유효량 내에서 단일 투여할 수도 있고 몇 차례에 걸쳐 다중 첨가할 수도 있다. 또한, 사이토카인 각각이 첨가되는 시기도 조절될 수 있다. 바람직하게는, 모든 사이토카인을 세포 배양과 동시에 단일 처리하는 것이다. 사이토카인을 첨가 후 배지에서 1일 내지 4일 배양하는 것이 바람직하다.

본 발명은 독성이 거의 없는 세포 치료의 효율을 결정짓는 중요한 요소인 CD T4 세포 활성을 유도하는 간단하면서도 효과적인 방법을 제공한다. 상기 방법으로 활성을 가지게 된 CD4 T 세포는 다양한 용도의 암, 박테리아 감염 및 면역질환 치료를 위한 생물학적 제제로 사용될 수 있다.

또 다른 양태로서, 본 발명은 상기의 방법으로 활성화된 CD4 T 세포를 포함하는 박테리아 감염 질환을 예방 또는 치료하는 조성물에 관한 것이다.

또 다른 양태로서, 본 발명은 상기의 방법으로 활성화된 CD4 T 세포를 박테리아 감염된 환자에게 투여하여 박테리아 감염 질환을 예방 또는 치료하는 방법에 관한 것이다.

본 발명에서 용어, "예방"이란 활성화된 CD4 T 세포 투여에 의해 박테리아 감염을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

본 발명에서 용어, "치료"란 활성화된 CD4 T 세포 투여에 의해 박테리아 감염에 의한 질환 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

본 발명에서 용어, "환자"는 활성화된 CD4 T 세포 투여에 의해 증상이 호전될 수 있는 박테리아 감염 질환을 가진 인간과 소, 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개 등의 동물을 의미한다. GM-CSF, IFN-gamma, TNF-alpha, Lectin 및 IL-4의 사이토카인 배합물에 의해 활성화된 CD4 T 세포를 환자에게 투여함으로써, 박테리아 감염 질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.

본 발명의 방법으로 활성화된 CD4 T 세포는 기존의 항-박테리아 활성을 가지는 물질과 조합하여 투여할 수 있다. 상기 CD4 T 세포를 투여함으로써, 박테리아 감염된 세포를 효과적으로 제거함으로써 항-박테리아 활성을 가지게 된다.

본 발명의 방법으로 활성화된 CD4 T 세포 투여로 치료할 수 있는 박테리아 감염 질환은 특별히 제한되지 않지만, 바람직하게는 살모넬라균 감염에 의해 유발된 질환이다. 살모넬라균에는 살모넬라 아리조네(*Salmonella arizonae*), 살모넬라 콜레라에수스(*Salmonella choleraesuis*), 살모넬라 엔테리티디스(*Salmonella enteritidis*), 살모넬라 티피(*Salmonella typhi*) 및 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*) 등이 있다. 보다 바람직하게는, 살모넬라 티피뮤리움 감염에 의해 유발된 질환이다.

상기 CD4 T 세포 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 비경구 투여, 예를 들어, 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 상기 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

상기 조성물은 세포 치료에 일반적으로 사용되는 약제학적 담체와 함께 투여될 수 있으며, 이런 담체로 생리학적 식염수를 예로 들 수 있다.

본 발명의 CD4 T 세포는 치료학적으로 유효한 양으로 투여한다.

용어 "치료학적으로 유효한 양(therapeutically effective amount)"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효량은 질병의 중증도, 연령, 성별, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

실시예 1: 살모넬라 감염증을 억제하기 위한 CD4 T 세포의 제조

마우스(BALB/c, SLC Japan)의 비장을 꺼내어 cell grinder로 파쇄하였다. 파쇄된 세포를 RPMI 배지 상태에서 1500rpm으로 원심분리한 뒤, RBC lysing buffer(Sigma,USA) 10ml를 더하여 상온에서 10분간 반응시켰다. 1500rpm으로 원심분리 후 RPMI 배지 10ml로 3회 교환하여 적혈구를 제거하였다. 얻어진 단핵면역세포에서 항-CD4 T 세포 항체를 사용하여 MACS 방법을 이용하여 CD4 T 세포를 분리하였다. 분리된 CD4 T 세포를 사이토카인 및 10% FBS를 포함하는 RPMI 배지에 넣어서 48시간 배양하였다.

첨가되는 사이토카인의 양은 배지 1ml 당 GM-CSF 0.1 μ g, IFN-gamma 1 μ g, TNF-alpha 0.1 μ g, Lectin 50 μ g, IL-4 0.1 μ g이 되도록 하였다.

배양된 세포를 수집하여 이를 PBS에 현탁하여 세포치료제로 사용하였다.

실시예 2: 마우스 모델에서 살모넬라 감염 후에 세포치료제에 의한 효과분석

1×10^4 의 살모넬라균(Salmonella typhimurium; 고려대학교)을 마우스에 경구 투여하여 박테리아 감염을 유발하였다. 실시예 1의 방법으로 활성화시킨 CD4 T 세포를 PBS 용액에 1×10^6 되도록 현탁시켜 살모넬라균으로 감염된 마우스에 정맥주사 하였다.

마우스의 생존률을 PBS만을 투여한 대조군 마우스, 세포주 마크로파아지 또는 CD4 T 세포를 투여한 실험군 마우스와 비교하였다(표 1).

[표 1]

	Control (생존 마우스/전체)	macrophage (생존 마우스/전체)	CD8 T cell (생존 마우스/전체)	CD4 T cell (생존 마우스/전체)
2	10/10	10/10	10/10	10/10
4	8/10	10/10	10/10	10/10
8	2/10	10/10	10/10	10/10
10	0/10	6/10	8/10	10/10
12	0/10	0/10	7/10	9/10
14	0/10	0/10	2/10	9/10
16	0/10	0/10	2/10	9/10

활성화된 CD4 T 세포를 살모넬라균 감염된 마우스로 투여할 경우, 마우스의 생존률이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

실시예 3: 마우스 모델에서 살모넬라균 감염증에 대한 세포치료제의 백신효과 분석

살모넬라균 감염 후 실시예 1의 방법으로 활성화된 CD4 T 세포를 처리하여 생존한 마우스군(9 마리)에 대하여, 1×10^4 의 살모넬라균을 경구 투여하여 감염을 유도한 후 살모넬라균 감염된 적 없는 마우스에 PBS만 투여한 대조군(9 마리)과의 생존률 비교로 CD4 T 세포 투여에 의한 백신효과를 살펴보았다.

그 결과, CD4 T 세포 투여에 의하여 생존한 마우스는 살모넬라균 재감염에 대하여 100%의 예방효과를 가지는 것을 알 수 있었다.

발명의 효과

본 발명의 방법으로 활성화된 CD4 T 세포는 살모넬라균 등의 박테리아 감염 질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

개체의 생물학적 시료로부터 CD4 T 세포를 분리하는 단계; 및 상기 CD4 T 세포를 GM-CSF, IFN-gamma, TNF-alpha, Lectin 및 IL-4을 포함하는 사이토카인을 첨가한 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 시험관내에서 CD4 T 세포를 활성화시키는 방법.

청구항 2.

제1항에 있어서, 생물학적 시료가 혈액(blood), 혈장(plasma), 림프절(lymph node), 비장(spleen), 흉선(thymus) 또는 골수(bone marrow)인 방법.

청구항 3.

제1항에 있어서, 사이토카인의 농도가 배지 1ml 당, 0.05 내지 0.2 μ g의 GM-CSF, 0.5 내지 2 μ g의 IFN-gamma, 0.05 내지 0.2 μ g의 TNF-alpha, 40 내지 60 μ g의 Lectin 및 0.05 내지 0.2 μ g의 IL-4인 방법.

청구항 4.

제1항에 있어서, 1일 내지 4일 배양하는 방법.

청구항 5.

제1항의 방법으로 활성화된 CD4 T 세포를 포함하는 박테리아 감염 질환을 예방 또는 치료하는 조성물.

청구항 6.

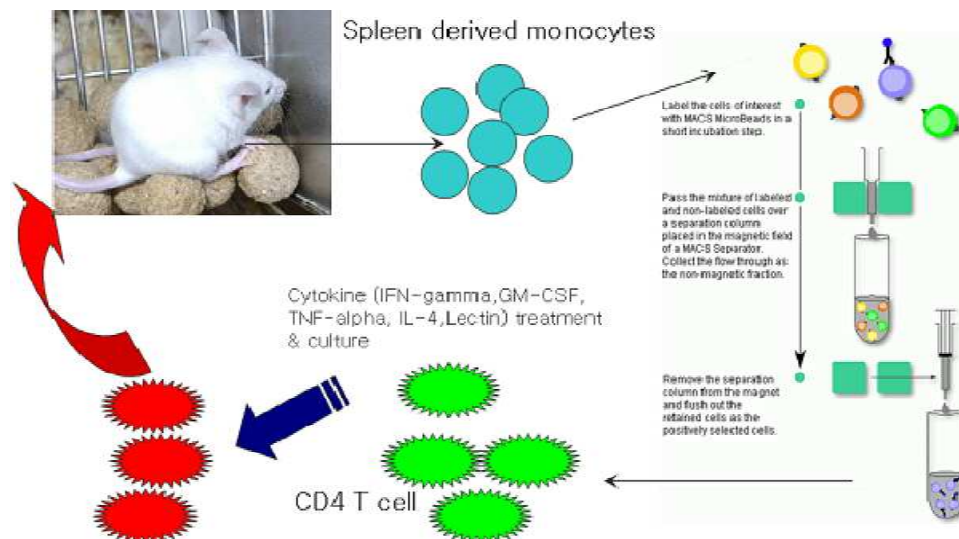
제5항에 있어서 박테리아가 살모넬라(*Salmonella*)인 조성물.

청구항 7.

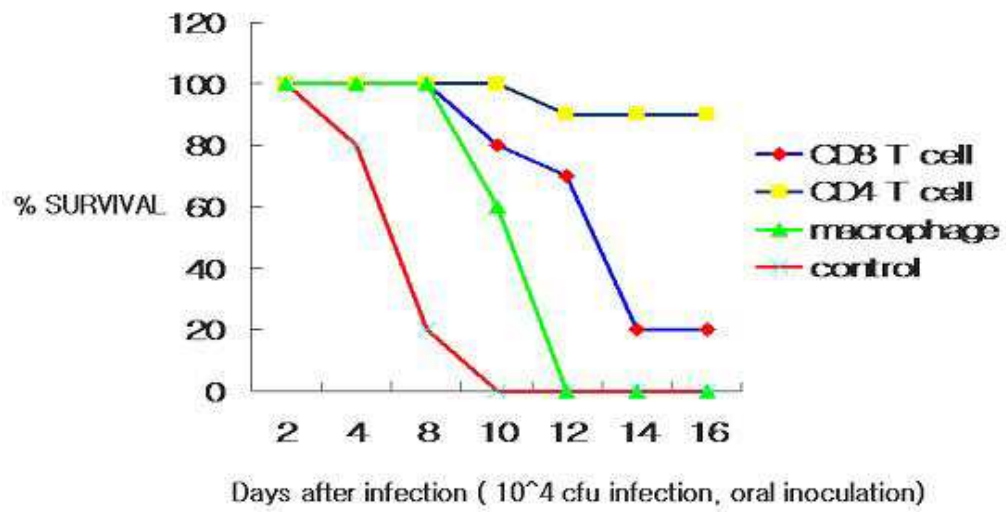
제6항에 있어서 박테리아가 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*) 인 조성물.

도면

도면1



도면2



도면3

