



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0067584
(43) 공개일자 2016년06월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/02 (2006.01) *A61K 38/17* (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01) *C07K 14/46* (2006.01)
C12N 5/0781 (2010.01)

(21) 출원번호 10-2014-0173145

(22) 출원일자 2014년12월04일

심사청구일자 2014년12월04일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김태성

서울특별시 중랑구 신내로21길 16, 512동 1203호 (목동, 신내대림아파트)

김면수

서울특별시 강동구 천호대로 1055, 105동 1003호 (천호동, 태영아파트)

(74) 대리인

특허법인다나

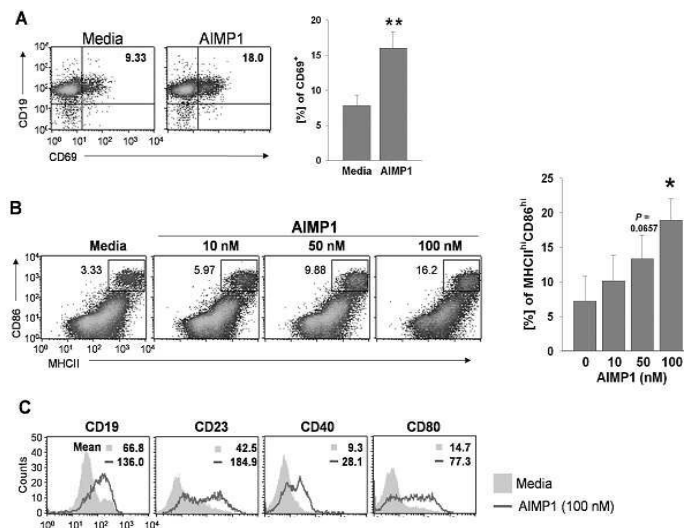
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 AIMP1을 포함하는 B 세포 활성화용 조성물

(57) 요약

본 발명은 AIMP1 (aminoacyl tRNA synthetase interacting multifunctional protein 1) 폴리펩티드 또는 AIMP1 단백질을 포함하는 B 세포 활성화용 조성물 및 B 세포 활성화 방법에 관한 것이다. 본 발명의 AIMP1 폴리펩티드 또는 AIMP1 단백질을 유효성분으로 포함하는 조성물은 직접적으로 B 세포를 활성화하고, 편향성 없이 효과적으로 항체 클래스 전환을 유도할 수 있다. 이에 따라, 본 발명의 AIMP1 폴리펩티드 또는 AIMP1 단백질을 유효성분으로 포함하는 조성물은 면역 증강이 필요한 다양한 질환 및 증상의 치료, 개선 또는 예방을 위하여 사용될 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 조성물은 면역 증강제 또는 백신 보조제로 이용될 수 있고, 만성 미생물 감염증이나 암세포에 대한 치료제 등으로 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2014R1A2A2A01005031

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원

연구과제명 AIMP1의 B cell 활성화인자로서의 역할 및 작용기전 규명

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2014.05.01 ~ 2017.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

AIMP1(aminoacyl tRNA synthetase interacting multifunctional protein 1) 폴리펩티드 또는 AIMP1 단백질을 유효성분으로 포함하는 B 세포 활성화용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, AIMP1 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 것인 B 세포 활성화용 조성물.

청구항 3

AIMP1(aminoacyl tRNA synthetase interacting multifunctional protein 1) 폴리펩티드 또는 AIMP1 단백질을 B 세포에 처리하고, 상기 B 세포를 배양하는 것을 포함하는 B 세포 활성화 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, AIMP1 폴리펩티드 또는 AIMP1 단백질은 50 nM 내지 200nM로 처리하는 것인 B 세포 활성화 방법.

청구항 5

AIMP1(aminoacyl tRNA synthetase interacting multifunctional protein 1) 폴리펩티드 또는 AIMP1 단백질을 유효성분으로 포함하는 면역 증강용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, AIMP1 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 것인 면역 증강용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 AIMP1 (aminoacyl tRNA synthetase interacting multifunctional protein 1) 폴리펩티드 또는 AIMP1 단백질을 포함하는 B 세포 활성화용 조성물 및 B 세포 활성화 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] B 세포는 항원의 분자 구조를 인식하여 항원 특이적 항체를 생성함으로써 병원성 미생물이나 암세포 등으로부터 인체를 보호하는 면역 세포로서, 체액성 면역체계에서 가장 중요한 역할을 한다. B 세포가 대량의 항체를 생성하기 위해서는 활성화 과정이 필수적이며, 활성화는 Th 세포(helper T cell)와의 상호작용에 의해서 발생하거나 (T cell-dependent activation; Victora, G.D., and Nussenzweig, M.C. 2012. Germinal centers. Annu. Rev. Immunol. 30: 429-457), 또는 B 세포가 항원을 직접 인식하거나 다른 세포들에서 분비된 B 세포 활성화 인자를 인식하여 발생한다 (T cell-independent activation; Hess, C., Winkler, A., Lorenz, A.K., Holecska, V., Blanchard, V., Eiglmeier, S., Schoen, A.L., Bitterling, J., Stoeck, A.D., Petzold, D., Schommartz, T.,

Mertes, M.M., Schoen, C.T., Tiburzy, B., Herrmann, A., Kohl, J., Manz, R.A., Madaio, M.P., Berger, M., Wardemann, H., and Ehlers, M. 2013. T cell-independent B cell activation induces immunosuppressive sialylated IgG antibodies. J. Clin. Invest. 123: 3788-3796; Vincent, F.B., Saulep-Easton, D., Figgett, W.A., Fairfax, K.A., and Mackay, F. 2013. The BAFF/APRIL system: emerging functions beyond B cell biology and autoimmunity. Cytokine Growth Factor Rev. 24: 203-215).

[0003] BAFF(B cell activating factor), APRIL(a proliferation-inducing ligand) 등 현재까지 밝혀진 B 세포 활성화 인자들은 대부분 TNFSF (tumor necrosis factor super family)에 속하는 인체 내 항체 생성에 중요하게 작용하는 단백질이다. 또한, 이들은 수지상 세포(dendritic cell), 대식세포(macrophage), 표피 세포(epithelial cell) 등 국한된 종류의 세포들에서 발현된다 (Vincent, F.B., Saulep-Easton, D., Figgett, W.A., Fairfax, K.A., and Mackay, F. 2013. The BAFF/APRIL system: emerging functions beyond B cell biology and autoimmunity. Cytokine Growth Factor Rev. 24: 203-215).

[0004] 한편, AIMP1(aminoacyl tRNA synthetase interacting multifunctional protein 1)은 아미노아실 tRNA 합성효소체 (Aminoacyl-tRNA-synthetase complex)의 구조적 안정화에 기여하는 구성 단백질로써 단백질을 생성하는 모든 세포에서 발현된다 (Park, S.G., Choi, E.C., and Kim, S. 2010. Aminoacyl-tRNA synthetase-interacting multifunctional proteins (AIMPs): a triad for cellular homeostasis. IUBMB Life 62: 296-302). 최근에는, AIMP1이 세포 외부로 분비되어 상처치유 작용, 혈당조절 작용 등의 기능이 있다고 알려졌다 (Park, S.G., Shin, H., Shin, Y.K., Lee, Y., Choi, E.C., Park, B.J., and Kim, S. 2005. The novel cytokine p43 stimulates dermal fibroblast proliferation and wound repair. Am. J. Pathol. 166: 387-398; Park, S.G., Kang, Y.S., Kim, J.Y., Lee, C.S., Ko, Y.G., Lee, W.J., Lee, K.U., Yeom, Y.I., and Kim, S. 2006. Hormonal activity of AIMP1/p43 for glucose homeostasis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 103: 14913-14918). 또한, AIMP1은 염증 유발성 사이토카인으로서 수지상 세포와 대식세포에 작용해 면역세포 반응을 조절하는 등 (Kim, E., Kim, S.H., Kim, S., and Kim, T.S. 2006. The novel cytokine p43 induces IL-12 production in macrophages via NF-kappaB activation, leading to enhanced IFN-gamma production in CD4+ T cells. J. Immunol. 176: 256-264; Kim, E., Kim, S.H., Kim, S., Cho, D., and Kim, T.S. 2008. AIMP1/p43 protein induces the maturation of bone marrow-derived dendritic cells with T helper type 1-polarizing ability. J. Immunol. 180: 2894-2902), 다기능 단백질로서의 연구가치가 높은 단백질이다.

[0005] 현재까지, AIMP1의 B 세포 활성화와 관련하여서는, 알려진 바 없다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) J. Immunol. 176: 256-264
(비특허문헌 0002) IUBMB Life 62: 296-302

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 AIMP1 (aminoacyl tRNA synthetase interacting multifunctional protein 1) 폴리펩티드 또는 AIMP1 단백질의 B 세포 활성화에의 새로운 용도에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 AIMP1 (aminoacyl tRNA synthetase interacting multifunctional protein 1) 폴리펩티드 또는 AIMP1 단백질을 유효성분으로 포함하는 B 세포 활성화용 조성물, B 세포 활성화 방법 및 면역 증강용 조성물에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 AIMP1(aminoacyl tRNA synthetase interacting multifunctional protein 1) 폴리펩티드 또는 AIMP1

단백질을 유효성분으로 포함하는 B 세포 활성화용 조성물을 제공한다.

[0009] 본 발명은 또한, AIMP1(aminoacyl tRNA synthetase interacting multifunctional protein 1) 폴리펩티드 또는 AIMP1 단백질을 B 세포에 처리하고, 상기 B 세포를 배양하는 것을 포함하는 B 세포 활성화 방법을 제공한다.

[0010] 본 발명은 또한, AIMP1(aminoacyl tRNA synthetase interacting multifunctional protein 1) 폴리펩티드 또는 AIMP1 단백질을 유효성분으로 포함하는 면역 증강용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명의 AIMP1 폴리펩티드 또는 AIMP1 단백질을 유효성분으로 포함하는 조성물은 직접적으로 B 세포를 활성화하고, 편향성 없이 효과적으로 항체 클래스 전환을 유도할 수 있다. 이에 따라, 본 발명의 AIMP1 폴리펩티드 또는 AIMP1 단백질을 유효성분으로 포함하는 조성물은 면역 증강이 필요한 다양한 질환 및 증상의 치료 및 개선에 사용될 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 조성물은 면역 증강제 또는 백신 보조제로 이용될 수 있고, 만성 미생물 감염증이나 암세포에 대한 치료제 등으로 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 AIMP1에 의한 B 세포 활성화 표지 분자의 발현 증가 효과를 확인한 결과를 보여준다.
 도 2는 AMIP1에 의한 B 세포 활성화 효과가 내독소 오염에 기인한 것이 아니라 AIMP1 고유의 작용에 의한 것임을 보여준다.
 도 3은 AMIP1에 의한 B 세포 증식 증가 효과를 확인한 유세포 분석 결과를 보여준다.
 도 4는 B 세포에서, AMIP1에 의한 항원 흡수를 증가 효과를 확인한 유세포 분석 결과를 보여준다.
 도 5는 AMIP1에 의한 AID(activation-induced deaminase) 발현 증가 효과를 확인한 결과를 보여준다.
 도 6은 B 세포에서 AMIP1에 의한 항체 클래스 전환 효과를 확인한 결과를 보여준다.
 도 7은 생체 내에서, AMIP1에 의한 B 세포 활성화 유도 효과를 확인한 결과를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] AIMP1은 아미노아실 tRNA 합성효소체 (Aminoacyl-tRNA-synthetase complex)의 구조적 안정화에 기여하는 구성 단백질로, 상처치유 작용, 혈당조절 작용 등이 있을 뿐 아니라, 수지상 세포와 대식세포에 작용해 면역세포 반응을 조절하는 등 다양한 활성이 있다고 알려진 다기능 단백질이다. 본 발명자들은 이와 같이 AIMP1의 다양한 기능을 연구하였고, 그 결과 AIMP1이 B 세포를 직접적으로 활성화하며, 편향성 없이 효과적으로 항체 클래스 전환을 유도함을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

[0014] 따라서, 본 발명은 AIMP1(aminoacyl tRNA synthetase interacting multifunctional protein 1) 폴리펩티드 또는 AIMP1 단백질을 유효성분으로 포함하는 B 세포 활성화용 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명은 또한, AIMP1(aminoacyl tRNA synthetase interacting multifunctional protein 1) 폴리펩티드 또는 AIMP1 단백질을 B 세포에 처리하고, 상기 B 세포를 배양하는 것을 포함하는 B 세포 활성화 방법을 제공한다.

[0016] 본 명세서에서 용어 AIMP1과 AIMP1 단백질, AIMP1과 AIMP1 폴리펩티드는 상호 교환적으로 사용될 수 있다.

[0017] 면역 반응은 크게 체액성 면역 반응과 세포성 면역 반응이 존재하고, 그 중에서 B 세포가 주도하는 것은 체액성 면역반응이다. 체액성 면역 반응은 체내에 들어온 항원에 특이적인 항체를 생성하는 것으로, 체내에 항원이 유입되면 대식세포와 같은 항원제시세포가 항원을 보조 T 세포 및 B 세포에 제공한다. 항원제시세포에 의하여 활성화된 보조 T 세포와의 상호작용에 의하거나, B 세포가 항원을 직접 인식하거나, 또는 다른 세포들에서 분비된 B 세포 활성화 인자들에 의하여 B 세포가 활성화되면, B 세포가 형질세포가 되어 항체를 생성하게 된다. 또한, B 세포에서 처음으로 발현되는 항체는 면역 글로불린 M이지만, B 세포에서 항체 클래스 전환이 일어나, 면역글로불린 G, 면역글로불린 A와 같은 다른 종류의 면역글로불린이 생성되어, 항체의 다양성이 확보된다. 즉, 항체 생성 면역 반응이 일어나기 위해서는 B 세포의 활성화가 매우 중요한 요소이며, 다양한 항원에 대응하기 위하여

항체 클래스 전환 또한 중요한 요소라 할 수 있다.

- [0018] 하기 실시예에서는, AIMP1에 의한 B 세포의 활성화 및 항체 클래스 전환 유도 능력을 확인하였다.
- [0019] B 세포가 활성화 되면, 세포 표면 활성화 표지 분자들 (MHCII, CD19, CD23, CD40, CD69, CD80, CD86 등)의 발현, B 세포 증식 및 항원 흡수율 등이 증가한다 (Stavnezer, J., Guikema, J.E., and Schrader, C.E. 2008. Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu. Rev. Immunol.* 26: 261-292; Xu, H., Liew, L.N., Kuo, I.C., Huang, C.H., Goh, D.L., and Chua, K.Y. 2008 The modulatory effects of lipopolysaccharide-stimulated B cells on differential T-cell polarization. *Immunology* 125(2):218-28). 따라서, B 세포 활성화는 세포 표면 활성화 표지 인자들의 발현 증가, B 세포 증식 증가 및 항원 흡수율 증가로 정의될 수 있다. AIMP1과 함께 B 세포를 배양하였을 때, 처음에는 B 세포 초기 활성화 표지 인자인 CD69의 발현이 증가하였고, 이후 MHCII, CD19, CD23, CD40, CD80, CD86 분자들의 표면 발현 또한 증가하였다.
- [0020] 또한, B 세포 활성화의 또 다른 표현 현상인 B 세포의 증식 증가 여부를 확인한 결과 (Stavnezer, J., Guikema, J.E., and Schrader, C.E. 2008. Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu. Rev. Immunol.* 26: 261-292), AIMP1에 의해 B 세포의 증식이 증가함을 확인할 수 있었고, 이는 내독소 오염에 의한 것이 아니라 AIMP1 고유의 기능임을 확인할 수 있었다.
- [0021] 또한, AIMP1 처리된 B 세포에서 텍스트란(dextran)에 대한 세포 이물 흡수율이 증가함을 확인함으로써 (Xu, H., Liew, L.N., Kuo, I.C., Huang, C.H., Goh, D.L., and Chua, K.Y. 2008 The modulatory effects of lipopolysaccharide-stimulated B cells on differential T-cell polarization. *Immunology* 125(2):218-28), AIMP1이 B 세포 활성화 기능이 있음을 알 수 있었다.
- [0022] 활성화된 B 세포는 Th1/Th2 세포의 도움 등과 같은 주변 환경에 따라 분화의 방향성이 결정되어, IgG1, IgG2, IgG3, IgE, IgA 등으로의 항체 클래스 전환이 일어난다 (King, C. 2009. New insights into the differentiation and function of T follicular helper cells. *Nat. Rev. Immunol.* 9(11):757-66). 다양한 항원에 대하여 대항하기 위하여 항체 클래스 전환이 필수적이고, 광범위한 면역 증강 효과를 위해서는 편향되지 않은 항체 클래스 전환 유도가 필요하다 (Petrovsky, N. 2006. Novel human polysaccharide adjuvants with dual Th1 and Th2 potentiating activity. *Vaccine.* 12;24 Suppl. 2:S2-26-9). 따라서 AIMP1에 의한 B 세포 활성화 유도 시, 항체 클래스 전환이 유도되는지 여부, 클래스 전환이 유도된다면 IgG1, IgG2, IgG3, IgE, IgA 등 특정 방향으로만 유도되는 편향성은 없는 지를 확인하였다. B 세포에서 항체 클래스 전환은 B 세포에서 AID(activation-induced deaminase) 발현증가, 단백질 수준에서 클래스 전환 확인으로 정의될 수 있다. 그 결과, AIMP1에 의하여 항체 클래스 전환을 유도하는 AID 발현 증가를 확인할 수 있었으며, 나아가 AIMP1 단독 처리만으로도 IgG1, IgG2, IgG3, IgE로의 항체 클래스 전환이 일어남을 단백질 수준에서 확인하였다. 즉, AIMP1이 B 세포 활성화를 유발할 뿐만 아니라, B 세포분화에 직접 작용하여 거의 모든 클래스로의 항체 전환을 유도함을 알 수 있었다.
- [0023] 본 발명의 B 세포 활성화용 조성물은 생체 외 조건인, 인비트로(in vitro), 엑스비보(ex vivo) 조건에서 사용될 수 있다.
- [0024] 한 구체예에서, AIMP1 폴리펩티드 또는 AIMP1 단백질을 B 세포에 50 nM 내지 200nM로 처리하고, 상기 B 세포를 배양하여 B 세포를 활성화할 수 있다.
- [0025] 또한 동물 모델을 이용하여 확인한 결과, 이러한 AIMP1에 의한 B 세포의 활성화 효과는 생체 내에서도 유지됨을 확인할 수 있었다.
- [0026] 위에서 기술한 바와 같이, 본 발명의 AIMP1은 B 세포 활성화 작용 및 항체 클래스 전향 작용이 있고, 이러한 작용으로 인하여 궁극적으로 항체 생성을 증가시키고 면역 기능을 증강시키는 효과가 있다. 따라서, 본 발명의 AIMP1은 B 세포 활성화 및 항체 클래스 전환 유도 효과를 통하여, 면역 증강이 필요한 다양한 질병 또는 증상의 개선, 치료 또는 예방을 위하여, 면역 증강제 및 백신 보조제로 사용될 수 있다. 면역 증강제 및 백신 보조제의 경우에도, B 세포 활성화와 관련하여 상기에서 기술한 모든 부분이 적용 또는 준용될 수 있다.
- [0027] B 세포활성화 유도를 통한 면역 증강이 필요한 질병의 예는, 이에 제한되는 것은 아니나, 결핵, 콜레라 등의 세균 감염증, 인플루엔자, C형 간염 바이러스, HIV 등의 바이러스 감염증, 기생충 감염증 및 암 등을 포함한다.
- [0028] 한 구체예에서, AIMP1 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시될 수 있다.

- [0029] 서열번호 1:
- [0030] MANNDVLRK LEQKGAEDQ IIEYLKQVS LLKEKAILQA TLREEKLRV ENAKLKKEIE
- [0031] ELKQELIQAE IQNGVKQIPF PSGTPLHANS MVSENVQST AVTTVSSGTK EQIKGGTGDE
- [0032] KKAKEKIEKK GEKKEKKQS IAGSADSKPI DVSRLDLRIG CIITARKHPD ADSLYVEEVD
- [0033] VGEIAPRTVV SGLVNHVPLE QMQNRMVILL CNLKPAMRG VLSQAMVMCA SSPEKIEILA
- [0034] PPNGSVPGDR ITFADFPGEP DKELNPKKKI WEQIQDLHT NDECVATYKG VPFEVKGKGV
- [0035] CRAQTMSNSG IK
- [0036] 본 발명의 AIMP1 폴리펩티드 또는 AIMP1 단백질을 유효성분으로 포함하는 조성물이 약학적 목적을 갖고, 예를 들어 면역 증강용 조성물 또는 백신 보조제로 사용되는 경우, 약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함할 수 있다.
- [0037] 약학적으로 허용되는 담체로는 예컨대, 비경구 투여용 담체를 추가로 포함할 수 있다. 비경구 투여용 담체는 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코스 및 글리콜 등을 포함할 수 있다. 또한, 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제가 있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸- 또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다. 그 밖의 약학적으로 허용되는 담체로는 다음의 문헌에 기재되어 있는 것을 참고로 할 수 있다(Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995).
- [0038] 본 발명의 AIMP1 폴리펩티드 또는 AIMP1 단백질을 유효성분으로 포함하는 조성물은 인간을 비롯한 포유동물에 비경구적 방법으로 투여할 수 있다. 비경구적인 투여방법으로는 이에 제한되는 것은 아니나, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장내 투여될 수 있다.
- [0039] 본 발명의 AIMP1 폴리펩티드 또는 AIMP1 단백질을 유효성분으로 포함하는 조성물은 또한 비경구 투여용 제제로 제형화 할 수 있다. 제형화할 경우에는 하나 이상의 완충제(예를 들어, 식염수 또는 PBS), 카보하이드레이트(예를 들어, 글루코스, 만노스, 수크로스, 또는 텍스트란 등), 항산화제, 정균제, 킬레이트화제(예를 들어, EDTA 또는 글루타치온), 충전제, 증량제, 결합제, 아췌반트(예를 들어, 알루미늄 하이드록사이드), 현탁제, 농후제 습윤제, 봉해제 또는 계면활성제, 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.
- [0040] 본 발명의 AIMP1 폴리펩티드 또는 AIMP1 단백질을 유효성분으로 포함하는 조성물이 주사제로 제형화 되는 경우에는 반드시 멸균되어야 하며 박테리아 및 진균과 같은 미생물의 오염으로부터 보호되어야 한다. 주사제의 경우 적합한 담체의 예로는 이에 한정되지는 않으나, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 이들의 혼합물 및/또는 식물유를 포함하는 용매 또는 분산매질일 수 있다. 보다 바람직하게는, 적합한 담체로는 행크스 용액, 링거 용액, 트리에탄올 아민이 함유된 PBS(phosphate buffered saline) 또는 주사용 멸균수, 10% 에탄올, 40% 프로필렌 글리콜 및 5% 텍스트로즈와 같은 등장 용액 등을 사용할 수 있다. 상기 주사제를 미생물 오염으로부터 보호하기 위해서는 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르빈산, 티메로살 등과 같은 다양한 항균제 및 항진균제를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 상기 주사제는 대부분의 경우 당 또는 나트륨 클로라이드와 같은 등장화제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0041]
- [0042] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예를 통해 상세히 설명한다. 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들에 한정되는 것은 아니다.
- [0043] 물질 및 방법
- [0044] B 세포의 분리 및 배양
- [0045] 7에서 10주령 마우스(C57/BL6, OrientBio, 성남시, 대한민국)의 림프절을 균질화하여 림프절세포를 획득하였다. 이어서 항-CD19-표지 마그네틱 비드(Miltenyi Biotech)를 이용해 자기활성 세포분리법(MACS)으로 CD19 양성 림프절 B 세포를 분리하였다. B 세포는 10% FBS(WelGENE Inc, 대구, 대한민국), 50 μ M 2-메르캅토에탄올(2-

mercaptoethanol, Sigma-Aldrich, St Louis, MO), 100 U/ml 페니실린(penicillin, Invitrogen), 0.1 mg/ml 스트렙토미신 (streptomycin, Invitrogen)이 첨가된 RPMI1640 배지(Thermo Scientific Rockford, IL)에서 배양하였다.

[0046] 시험관 내 또는 생체내 B 세포 활성화 표지 인자 측정

[0047] 분리된 림프절 B 세포를 48-웰 플레이트에서 5×10^5 cells/well씩 배양하였다. 음성 대조군으로 배지만 첨가된 것, 양성 대조군으로 리포폴리사카라이드 (LPS, lipopolysaccharide) 처리군을 사용하였으며, 실험군에는 100 nM AIMP1 단백질(AIMP1발현백터 제작 후, 영인프런티어(주) (서울시, 대한민국)에서 정제)을 처리하였다. PMB(polymyxin B) 처리군의 경우, 10 μ g/ml PMB를 AIMP1 또는 LPS와 동시에 처리하였다. 배양 15 시간 후 B 세포 표면 CD69 발현 정도를, 72 시간 후 MHCII, CD19, CD23, CD40, CD80, CD86 발현 정도를 유세포 분석법으로 확인하였다.

[0048] 생체 내 실험을 위해 마우스 꼬리 정맥에 PBS에 용해된 AIMP1 단백질 7.5 mg/kg씩 주사하고 20 시간 후 비장을 분리하였다. 비장세포 중 CD19 발현 B 세포를 형광항체로 표지하고, 그 중 CD69 형광항체로 염색되는 B 세포 비율을 유세포 분석법으로 확인하였다. 이 때, PBS만 주사된 마우스를 대조군으로 사용하였다.

[0049] B 세포 증식 측정

[0050] 0.5 μ M CFSE로 37°C에서 15 분 동안 분리된 림프절 B 세포를 표지하고, 96-웰 플레이트에서 1×10^5 cells/well씩 72 시간 동안 배양하였다. 음성 대조군으로 배지만 첨가된 것, 양성 대조군으로 LPS 처리군이 사용되었으며, 실험군에는 100 nM AIMP1 단백질이 처리되었다. PMB 처리군의 경우, 10 μ g/ml PMB가 AIMP1 또는 LPS와 동시에 처리하였다. B 세포의 증식 정도는 증식이 일어난 세포의 CFSE 표지 수준이 감소되는 것을 유세포분석법으로 확인하였다.

[0051] B 세포 항원 흡수율 측정

[0052] 24-웰 플레이트에서 1×10^6 cells/well씩 48 시간 동안 분리된 림프절 B 세포를 배양하였다. 음성 대조군으로 배지만 첨가된 것, 양성 대조군으로 LPS 처리군이 사용되었으며, 실험군에는 100 nM AIMP1이 처리되었다. 1차 배양 후, 각 세포들은 4°C 또는 37°C에서 30 분간 2차 배양된 후, 50 μ g/ml 플루오레세인 이소치오시아네이트-결합 텍스트란(FITC-conjugated dextran) 존재 하에서 1 시간 3차 배양하였다. B 세포의 항원 흡수율은 세포 안으로 흡수된 FITC의 형광 정도를 유세포 분석법으로 측정되었다.

[0053] 역전사 중합효소연쇄반응

[0054] 12-웰 플레이트에서 2×10^6 cells/well씩 48 시간 동안 분리된 림프절 B 세포를 배양하였다. 음성 대조군으로 배지만 첨가된 것, 양성 대조군으로 LPS 처리군이 사용되었으며, 실험군에는 100 nM AIMP1이 처리되었다. 배양된 B 세포로부터 RNA를 분리하여 역전사 반응으로 cDNA를 획득하였다. AID의 발현 정도를 측정하기 위해 획득된 cDNA를 주형(template)으로 사용하고, AID 프라이머(sense, 5' -AAATGTCCGCTGGGCCAA-3' ; anti-sense, 5' -CATCGACTTCGTACAAGGG -3')를 이용해 중합효소연쇄반응으로 AID의 mRNA 발현을 비교하였다.

[0055] 항체 클래스 전환 측정

[0056] 96-웰 플레이트에서 1×10^5 cells/well씩 96 시간 동안 분리된 림프절 B 세포를 배양하였다. 음성 대조군으로 배지만 첨가된 것, IgG2와 IgG3로의 항체 전환에 대한 양성 대조군으로 LPS (10 μ g/ml) 처리군, IgG1과 IgE로의 항체 전환에 대한 양성 대조군으로 LPS와 IL-4 (10 ng/ml) 동시 처리군, IgA로의 항체 전환에 대한 양성 대조군으로 LPS와 IL-4, IL-5 (2 ng/ml), TGF- β (2 ng/ml) 동시 처리군을 사용하였다. 실험군에는 200 nM AIMP1을 단독으로 처리하였다. 배양된 B 세포들은 0.05% trypsin/EDTA로 상온에서 3분 동안 처리하여 표면 항체들을

제거한 후, 각 항체 클래스에 특이적인 형광항체를 이용하여 세포 내 염색을 수행하고, 유세포 분석으로 측정하였다 (Wesemann, D.R., Magee, J.M., Boboila, C., Calado, D.P., Gallagher, M.P., Portuguese, A.J., Manis, J.P., Zhou, X., Recher, M., Rajewsky, K., Notarangelo, L.D., and Alt, F.W. 2011. Immature B cells preferentially switch to IgE with increased direct S μ to S ϵ recombination. J. Exp. Med. 19;208(13):2733-46).

[0057] 유세포분석

[0058] 세포 표면 분자의 경우, FACS 완충액에 단일세포 혼탁액을 준비하고 형광 항체를 1/250 비율로 첨가해 상온에서 15분 동안 염색하였다. 세포 내 염색이 필요한 경우, 표면 분자 염색 후 세포고정 및 세포막 투과화(permeabilization)를 Cytofix/Cytoperm과 Perm/Wash solution (BD Bioscience, San Diego, CA)을 이용해 진행하였다. 이어서, 형광 항체를 1/250 비율로 첨가해 4℃에서 1 시간 동안 염색하였다. 유세포분석은 FACSCalibur (BD Bioscience)를 이용하여 수행하였다.

[0059] 통계적 분석

[0060] 대조군과 실험군의 차이는 paired Student's *t*-test에 의해서 평가되었으며, *P*-values<0.05 인 경우 유의한 차이로 고려되었다.

[0061] [실시예 1] AIMP1에 의한 림프절 B 세포에서 표면 활성화 표지 분자 발현 증가 확인

[0062] B 세포에 대한 AIMP1의 작용을 확인하기 위해 마우스 림프절에서 CD19 양성 B 세포를 분리하고 AIMP1을 처리하였다. 100 nM AIMP1을 처리하고 15 시간 후 B 세포 표면의 CD69 발현을 유세포분석으로 확인한 결과 (도 1A), AIMP1에 의해 초기 B 세포 활성화 표지 분자인 CD69 발현 비율이 유의성 있게 증가함을 알 수 있었다 (3회 반복 시험 결과, ***P*<0.01, 미처리군에 대하여).

[0063] B 세포에 10, 50, 100 nM AIMP1을 처리하고 72 시간 후에 활성화된 MHCII^{hi}CD86^{hi} B 세포 비율을 확인한 결과 (도 1B), AIMP1 농도 의존적으로 활성화된 B 세포 비율이 증가함을 확인할 수 있었다 (3회 반복시험 결과, **P*<0.05, 미처리군에 대하여).

[0064] 또한, 배양시작 72 시간 후 CD19, CD23, CD40, CD80와 같은 다양한 B 세포 활성화 표지 분자들의 발현이 AIMP1 처리군에서 증가하는 것이 측정되었다(도 1C). 도 1에 나타난 바와 같이, AIMP1 단백질은 B 세포 표면 활성화 표지 인자들의 발현 증가를 초래하였다.

[0065] [실시예 2] PMB를 이용한 AIMP1 단백질 내 내독소 오염 확인

[0066] B 세포는 내독소에 대해 민감하게 반응하여 활성화되는 세포이므로, 실시예 1에서 나타난 AIMP1의 효과가 내독소 오염 때문인지 확인할 필요가 있다고 판단되었다. AIMP1 단백질이 내독소에 오염되었다면, B 세포에 AIMP1을 처리하고 PMB 존재 하에서 배양했을 때 B 세포 활성화 증가가 나타나지 않을 것은 자명하므로, 이를 토대로 내독소 오염 여부를 확인하였다. B 세포를 10 µg/ml PMB 처리 또는 미처리군으로 나누어 각각 500 ng/ml LPS또는 100 nM AIMP1을 첨가하고 72 시간 배양하였다. 이어서, MHCII^{hi}CD86^{hi} B 세포 비율을 유세포 분석법으로 확인한 결과 (도 2), PMB 미처리군에서 LPS에 의한 B 세포 활성화 증가가 PMB 처리 시 억제된 반면 (3회 반복시험 결과, ***P*<0.01, LPS 단독 처리군에 대하여), AIMP1에 의한 B 세포 활성화 증가는 PMB에 영향을 받지 않았다. 즉, B 세포 활성화를 유발하는 AIMP1의 효과는 내독소 오염에 기인한 것이 아닌 AIMP1 고유의 기능임을 확인할 수 있었다.

[0067] [실시예 3] AIMP1에 의한 림프절 B 세포 증식 증가 확인

[0068] B 세포 활성화는, 표면 활성화 표지 인자 외에도, B 세포 증식 증가로도 정의된다. 이에, B 세포 증식 증가 여부를 알아보기 위하여, 분리된 CD19 양성 B 세포를 CFSE로 표지하여 형광을 띠게 한 후, 100 nM AIMP1 또는 100

ng/ml LPS를 처리하였다. 이 때, 내독소 오염여부를 확인하기 위해 10 μ g/ml PMB 처리 또는 미처리군으로 나누어 배양하였다. 72 시간 배양 후, 유세포 분석으로 CFSE 발광 정도를 측정한 결과 (도3), AIMP1 처리군은 PMB 유무와 관계없이 CFSE 저발광 세포 비율이 증가하여, B 세포 증식이 AIMP1에 의해 증가됨을 확인할 수 있었다 (2회 반복시험 결과, $*P<0.05$, 미처리군에 대하여). 반면, LPS 처리군에서 증가하였던 세포 증식은 PMB 처리 시 현저히 감소하였다 (2회 반복시험 결과, $**P<0.01$, LPS 단독 처리군에 대하여). 즉, AIMP1에 의해 B 세포 증식이 증가하였으며 이는 내독소 오염 때문이 아닌 AIMP1 고유의 효과임을 확인할 수 있었다.

[0069] [실시예 4] AIMP1 처리된 림프절 B 세포에서 항원 흡수율 증가

[0070] B 세포 활성화를 확인하기 위한 수단으로 B 세포의 항원 흡수율을 측정하였다. CD19 양성 B 세포에 100 nM AIMP1 또는 1 μ g/ml LPS를 처리하여 48 시간 배양한 후 텍스트란-FITC를 1 시간 동안 처리하여 유세포 분석으로 흡수율을 측정하였다 (도 4). 그 결과, AIMP1 처리된 B 세포에서 텍스트란 흡수율이 증가하여, AIMP1이 B 세포 활성화를 유도함을 알 수 있었다.

[0071] [실시예 5] AIMP1에 의한 림프절 B 세포에서 AID 발현 증가

[0072] AIMP1이 B 세포를 활성화하여, 항체 클래스 전환을 유도하는지 확인하기 위하여, 항체 클래스 전환에 필수요소인 AID 발현이 증가하는지 알아보았다. CD19 양성 B 세포에 100 nM AIMP1 또는 200 ng/ml LPS를 처리하여 48 시간 배양한 후, B 세포로부터 RNA를 분리하였다. RNA로부터 역전사 효소 반응을 이용해 cDNA를 획득하였고, AID 특이적 프라이머를 이용해 중합효소연쇄반응을 실시하였다. AID 발현 정도는 중합효소연쇄반응물을 전기영동 및 DNA 시각화를 통해 표현되었다. 도 5에 나타난 바와 같이, AIMP1 처리 B 세포에서 AID의 발현이 증가함을 확인할 수 있었다.

[0073] [실시예 6] AIMP1 단독 처리에 의한 B 세포내 항체 클래스 전환 효과 확인

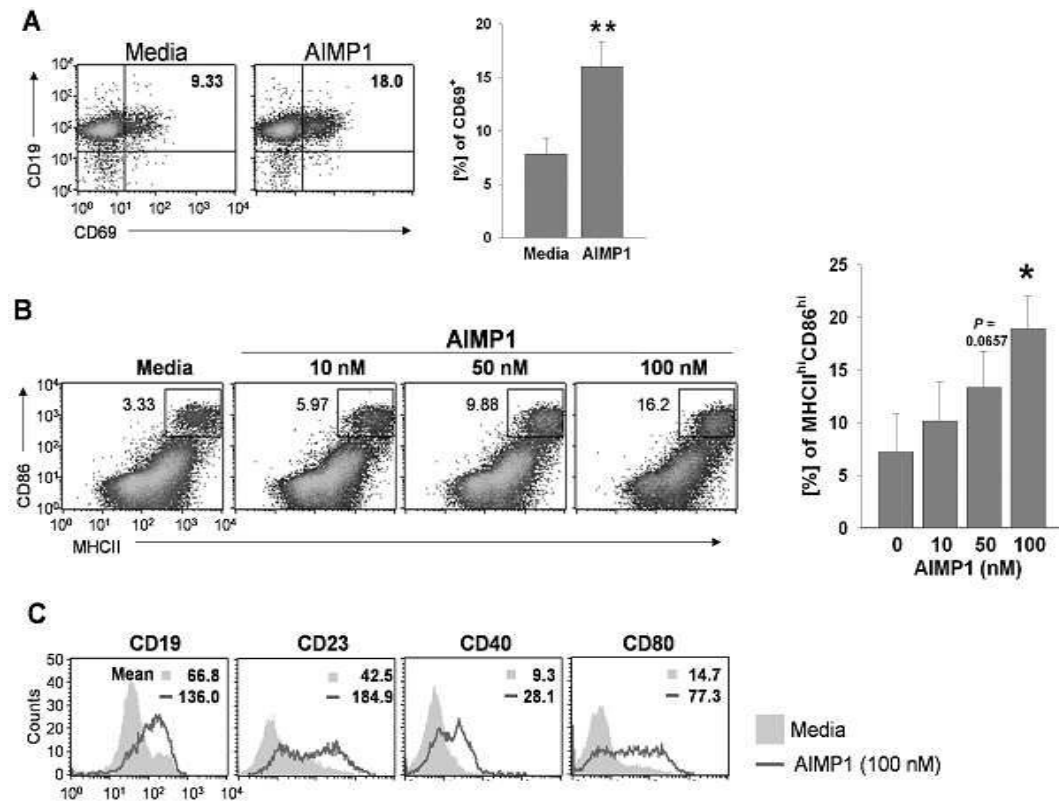
[0074] AIMP1에 의한 B 세포에서 AID 발현 증가 확인에 이어, AIMP1이 단백질 수준에서 항체 클래스 전환을 직접 유도하는지 확인하였다. 클래스 전환 측정은 상기 물질 및 방법에 기술된 바와 같이 수행되었다. 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, B 세포에 AIMP1을 처리하였을 때, 단독처리만으로도 IgG1, IgG2, IgG3, IgE로의 클래스 전환이 증가함을 알 수 있었으며, 이 증가는 통계적으로 유의함을 확인하였다 (3회 반복시험 결과, $*P<0.05$, $**P<0.01$, 미처리군에 대하여).

[0075] [실시예 7] 생체 내(In vivo) AIMP1 주입에 의한 비장 B 세포에서 활성화 표지 인자 발현 증가 확인

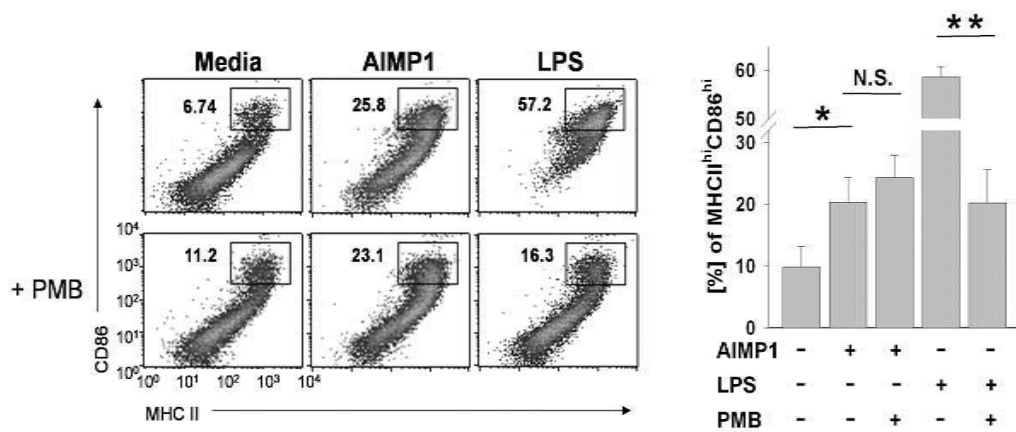
[0076] AIMP1에 의한 B 세포 활성화 증가를 생체 내 실험을 통해 확인하기 위해, 마우스 혈관에 AIMP1을 주사하고 비장에서 B 세포 반응을 확인하였다 (Yang, M., Sun, L., Wang, S., Ko, K.H., Xu, H., Zheng, B.J., Cao, X., and Lu, L. 2010. Novel function of B cell-activating factor in the induction of IL-10-producing regulatory B cells. J. Immunol. 1;184(7):3321-5). AIMP1 주입 20 시간 후 비장 세포를 분리하여 B 세포 활성화 표지 분자인 CD69의 발현 정도를 알아보았다. 그 결과 (도 7), AIMP1 주사된 쥐의 비장에 존재하는 B 세포에서 CD69 발현이 유의하게 증가함을 알 수 있었다 (3회 반복시험 결과, $*P<0.05$, 미처리군에 대하여). 즉, 생체 내 실험을 통해서도 AIMP1 처리에 의해 B 세포 활성화가 유도됨을 확인하였다.

도면

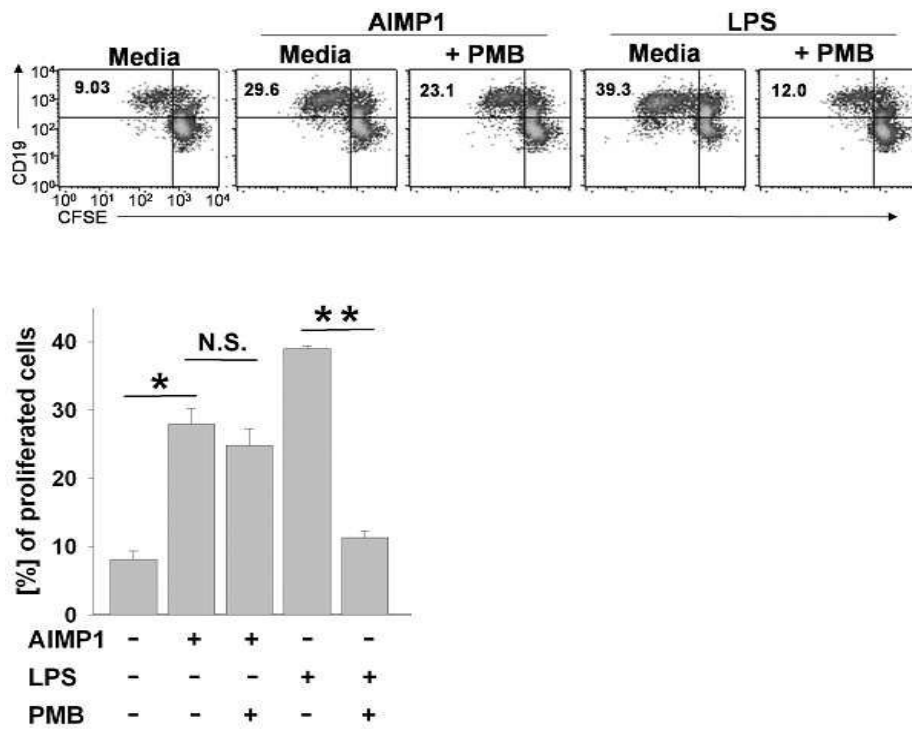
도면1



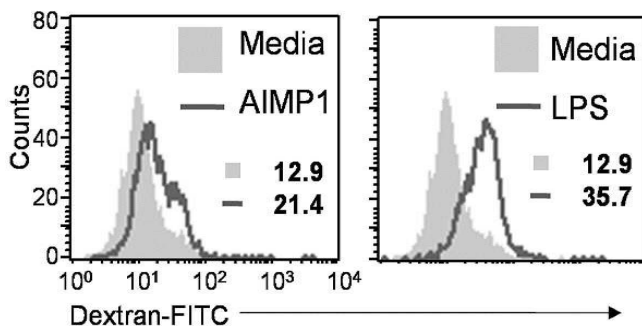
도면2



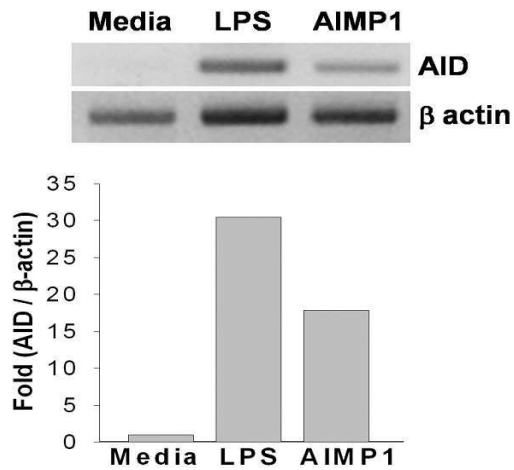
도면3



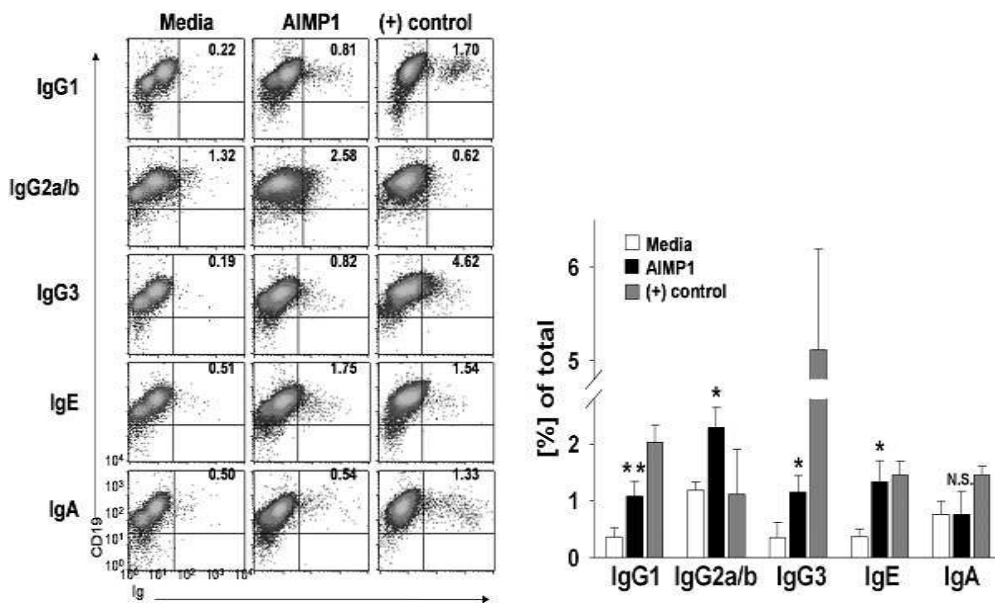
도면4



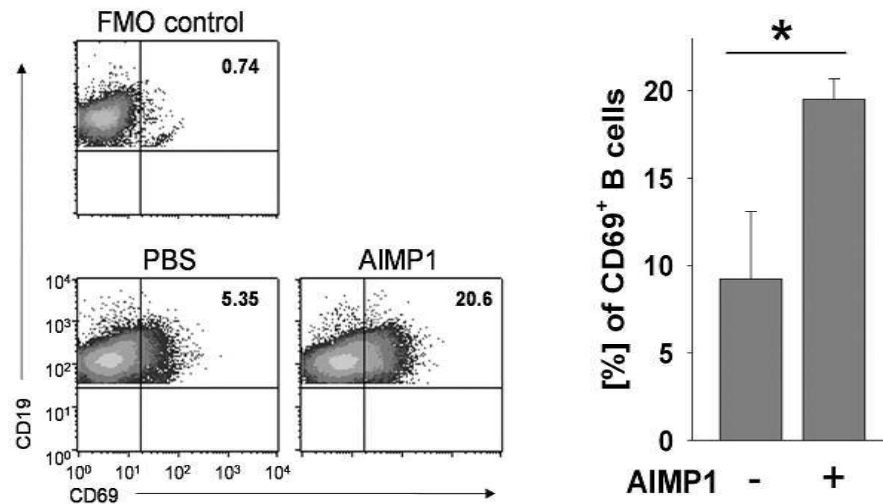
도면5



도면6



도면7



서열 목록

- <110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION
- <120> Composition for activating B cell comprising AIMP1
- <130> P14U13C1400
- <160> 1
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 312
- <212> PRT
- <213> homo sapiens
- <400> 1

Met Ala Asn Asn Asp Ala Val Leu Lys Arg Leu Glu Gln Lys Gly Ala
1 5 10 15
Glu Ala Asp Gln Ile Ile Glu Tyr Leu Lys Gln Gln Val Ser Leu Leu
20 25 30
Lys Glu Lys Ala Ile Leu Gln Ala Thr Leu Arg Glu Glu Lys Lys Leu
35 40 45
Arg Val Glu Asn Ala Lys Leu Lys Lys Glu Ile Glu Glu Leu Lys Gln
50 55 60
Glu Leu Ile Gln Ala Glu Ile Gln Asn Gly Val Lys Gln Ile Pro Phe
65 70 75 80
Pro Ser Gly Thr Pro Leu His Ala Asn Ser Met Val Ser Glu Asn Val
85 90 95
Ile Gln Ser Thr Ala Val Thr Thr Val Ser Ser Gly Thr Lys Glu Gln
100 105 110
Ile Lys Gly Gly Thr Gly Asp Glu Lys Lys Ala Lys Glu Lys Ile Glu
115 120 125
Lys Lys Gly Glu Lys Lys Glu Lys Lys Gln Gln Ser Ile Ala Gly Ser
130 135 140
Ala Asp Ser Lys Pro Ile Asp Val Ser Arg Leu Asp Leu Arg Ile Gly
145 150 155 160
Cys Ile Ile Thr Ala Arg Lys His Pro Asp Ala Asp Ser Leu Tyr Val
165 170 175
Glu Glu Val Asp Val Gly Glu Ile Ala Pro Arg Thr Val Val Ser Gly
180 185 190
Leu Val Asn His Val Pro Leu Glu Gln Met Gln Asn Arg Met Val Ile
195 200 205
Leu Leu Cys Asn Leu Lys Pro Ala Lys Met Arg Gly Val Leu Ser Gln
210 215 220
Ala Met Val Met Cys Ala Ser Ser Pro Glu Lys Ile Glu Ile Leu Ala
225 230 235 240
Pro Pro Asn Gly Ser Val Pro Gly Asp Arg Ile Thr Phe Asp Ala Phe

	245		250		255	
Pro	Gly	Glu	Pro	Asp	Lys	Glu
Leu	Asn	Pro	Lys	Lys	Lys	Ile
Trp	Glu					
	260		265		270	
Gln	Ile	Gln	Pro	Asp	Leu	His
Thr	Asn	Asp	Glu	Cys	Val	Ala
Thr	Tyr					
	275		280		285	
Lys	Gly	Val	Pro	Phe	Glu	Val
Lys	Gly	Lys	Gly	Val	Cys	Arg
Ala	Gln					
	290		295		300	
Thr	Met	Ser	Asn	Ser	Gly	Ile
Lys						
	305		310			