



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0119543
(43) 공개일자 2014년10월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 48/00 (2006.01) A61K 38/20 (2006.01)
A61K 35/28 (2006.01) A61P 31/10 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0035353

(22) 출원일자 2013년04월01일

심사청구일자 2014년02월07일

기술이전 희망 : 기술양도, 실시권허여, 기술지도

(71) 출원인

울산대학교 산학협력단

울산광역시 남구 대학로 93

(72) 발명자

권병석

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

김원영

울산광역시 울주군 범서읍 구영로 75-9, 310동 1601호 (구영1차우미린아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인충정

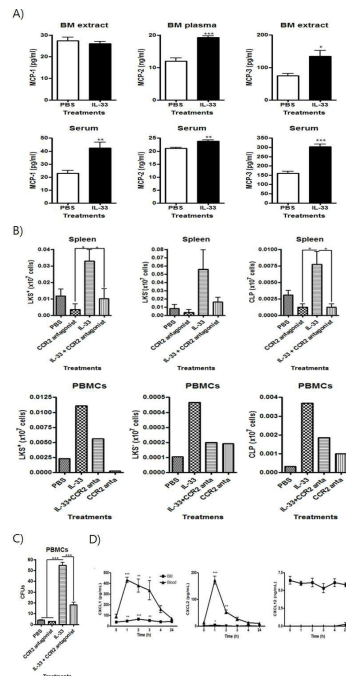
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 인터류킨-33을 포함하는 의약조성물

(57) 요약

본 발명은 인터류킨-33을 포함하는 의약 조성물에 관한 것으로, 인터류킨-33 또는 인터류킨-33을 코딩하는 유전자를 포함하는 조혈 줄기 및 전구 세포(hematopoietic stem and progenitor cells: HSPC) 동원용 의약조성물 또는 항진균제(anti-fungal)용 의약조성물을 제공한다. 본 발명의 인터류킨-33을 포함하는 의약 조성물은 HSPC를 말초부 또는 감염 부위로 동원되도록 유도하여 다핵형백혈구를 빠르게 모집하고 다핵형백혈구의 식균 활성을 강화시킴으로써 면역체계를 신속하게 재구성할 수 있어 균 감염에 대해 면역을 강화시킬 수 있다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

김주양

울산광역시 울주군 범서읍 구영로 75-9, 310동
1601호 (구영1차우미림아파트)

조홍래

울산광역시 동구 봉수로 450, 110동 1702호 (서부
동, 성원상떼빌아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2012RIAIA2008653

부처명 교육부

연구관리전문기관 울산대학교 산학협력단

연구사업명 일반연구자지원사업

연구과제명 면역손상 상태에서 IL-33에 의한 항진균 증진

기 여 율 1/1

주관기관 한국연구재단

연구기간 2012.05.01 ~ 2013.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

인터류킨-33 또는 인터류킨-33을 코딩하는 유전자를 포함하는 조혈 줄기 및 전구 세포(hematopoietic stem and progenitor cells: HSPC) 동원용 의약조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조혈 줄기 및 전구 세포의 동원은 CXCL1, CXCL2, CCL2 및 CCL7로 이루어진 케모카인 군에서 선택되는 적어도 하나 이상의 케모카인의 발현에 의해 유도되는 것을 특징으로 하는 HSPC 동원용 의약조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 케모카인은 혈관세포에서 분비되는 것을 특징으로 하는 HSPC 동원용 의약조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 혈관세포는 대동맥 내피 및 평활근 세포인 것을 특징으로 하는 HSPC 동원용 의약조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 골수외 조혈작용을 할 수 있는 것을 특징으로 하는 HSPC 동원용 의약조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 조성물은 골수에서 골수계 세포의 이출을 증진시키는 것을 특징으로 하는 HSPC 동원용 의약조성물.

청구항 7

인터류킨-33 또는 인터류킨-33을 코딩하는 유전자를 포함하는 항진균(anti-fungal)용 의약조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 의약조성물은 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 뉴모시스티스 무리나(*Pneumocystis murina*) 또는 니포스트론질러스 브라질리엔시스(*Nippostrongylus brasiliensis*)에 대하여 항균 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 항진균용 의약조성물.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 의약조성물은 다핵행백혈구(PMN)의 식균 활성을 강화시키는 것을 특징으로 하는 항진균용 의약조성물.

명세서

기술분야

본 발명은 인터류킨-33(Interlukin-33: IL-33)을 포함하는 의약조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 인터류킨-33을 이용하여 조혈 줄기 및 전구 세포(hematopoietic stem and progenitor cells: HSPC)를 말초부 또는 감

[0001]

염 부위로 동원되도록 유도하여 항진균(anti-fungal) 활성을 갖는 의약조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 인터류킨은 몸 안에 들어온 세균이나 해로운 물질을 면역계가 맞서 싸우도록 자극하는 단백질로 백혈구에서 만들어진다. 여러 종류의 백혈구에서 인터류킨이 발견되었는데 물리적·화학적 성상(性狀)이 확인된 것으로는 IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6이 있다. 이 인터류킨들은 함께 작용하여 백혈구가 질병에 대항하도록 연쇄적으로 반응한다.
- [0003] IL-33은 ST2L과 IL-1R 보조 단백질(accessory protein)로 구성된 헤테로다이머(heterodimer) 수용 복합체인 ST2를 통하여 신호를 보내는 IL-1 상과(上科, superfamily)에 속하는 최근 기재 인터류킨이다[Liew, F. Y. 등, (2010), Nat. Rev. Immunol. 10: 103-110; Kurowska-Stolarska, M. 등, (2011). J. Intern. Med. 269: 29-35]. IL-33은 외상(trauma) 또는 감염 중 조직 손상에 반응하는 선천적 면역 체계 세포에 위협을 알리기 위한 HMGB1(high-mobility group box protein 1)과 IL-1 α 와 유사하게, 경보(alarming)로 작용한다[Luthi, A. U. 등, (2009), Immunity 31: 84-98; Oboki, K. 등, (2010), Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 107: 18581-18586]. IL-33은 세포 손상, 기계적 부상 또는 괴사 후 세포외 기질(extracellular matrix)로 방출되며 염증을 유도하는 세포를 타겟으로 한다. IL-33은 또한 대식세포(macrophages), 수지상 세포(dendritic cells), 비만 세포(mast cells), 호염구(basophils), 호산구(eosinophils), 자연 보조 세포(natural helper cells), 뉴오사이트(nuocytes) 및 다분화능 전구체(multipotent progenitors)에도 작용함이 알려져 있다. IL-33은 또한 비만 세포 의존적 경로를 통하여 작동하는 섬유아세포(fibroblast) 및 Th1와 Th17 effector T 세포들의 활성화를 통합하는 만성 염증 관절염의 중요한 사이토카인(cytokine)이다[Xu, D. 등, (2008), Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 105: 10913-10918].
- [0004] 골수강(Bone marrow cavity)은 HSPC가 존재하고 HSPC의 조혈 활동이 일어나는 구역이다. 그러나 HSPC는 골수(bone marrow: BM)에 전적으로 고착되어 있지 않고, 일부 HSPC는 골수와 말초부(periphery) 사이를 끊임없이 재순환한다. 염증과 같은 스트레스 상태에서는 골수에서 대량의 조혈작용이 일어나고 HSPC 및 성숙 미성숙 백혈구를 대량으로 동원하여 순환시킨다.

- [0005] 이에, 본 발명의 발명자는 IL-33이 HSPC를 말초부 또는 감염 부위로 동원되도록 유도하여 다핵형백혈구(polymorphonuclear cell: PMN)를 빠르게 모집하고 PMN의 식균 활성을 강화시킴을 확인하고 본 발명에 이르렀다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명의 목적은 인터류킨-33을 이용하여 조혈 줄기 및 전구 세포(hematopoietic stem and progenitor cells)를 말초부 또는 감염 부위로 동원되도록 유도하는 HSPC 동원용 의약조성물을 제공하는 것이다.
- [0007] 본 발명의 다른 목적은 인터류킨-33을 이용하여 항진균 활성을 갖는 의약조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은, 인터류킨-33 또는 인터류킨-33을 코딩하는 유전자를 포함하는 조혈 줄기 및 전구 세포(hematopoietic stem and progenitor cells, HSPC) 동원용 의약조성물을 제공한다.
- [0009] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조혈 줄기 및 전구 세포의 동원은 CXCL1, CXCL2, CCL2 및 CCL7로 이루어진 케모카인(chemokine) 군에서 선택되는 적어도 하나 이상의 케모카인의 발현에 의해 유도되는 것을 특징으로 한다.
- [0010] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 케모카인은 혈관세포에서 분비되는 것을 특징으로 한다.
- [0011] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 혈관세포는 대동맥 내피(aortic endothelial) 및 평활근 세포(smooth muscle cells)인 것을 특징으로 한다.
- [0012] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물은 골수외 조혈작용을 할 수 있는 것을 특징으로 한다.
- [0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물은 골수에서 골수계 세포의 이출을 증진시키는 것을 특징으로 한다.

[0014] 또한, 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 인터류킨-33 또는 인터류킨-33을 코당하는 유전자를 포함하는 항진균용 의약조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 의약조성물은 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 뉴모시스티스 무리나(*Pneumocystis murina*) 또는 니포스트론질러스 브라실리엔시스(*Nippostrongylus brasiliensis*)에 대하여 항균 활성을 갖는 것을 특징으로 한다.

[0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 의약조성물은 다핵형백혈구(PMN)의 식균 활성을 강화시키는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명의 IL-33을 포함하는 의약조성물은 조혈 줄기 및 전구 세포를 말초부 또는 감염 부위로 동원되도록 유도하여 다핵형백혈구를 빠르게 모집하고 다핵형백혈구의 식균 활성을 강화시킴으로써 균에 대한 면역력을 높일 수 있다.

[0018] 따라서, 본 발명의 IL-33을 포함하는 의약조성물은 항진균제에 적용될 수 있으며, 본 발명의 IL-33을 포함하는 의약조성물을 포함하는 항진균제는 균 감염에 대한 면역을 강화시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1A는 IL-33 투여 C57BL/6 마우스의 골수 및 지라 내 시간에 따른 $CD11b^{+}Gr-1^{hi}$, $CD11b^{+}Gr-1^{int}$, $CD11b^{+}Gr-1^{lo}$ 및 $B220^{+}$ 세포 수 변화를 나타내는 그래프이고, 도 1B는 MyD88-결여 C57BL/6 마우스에 PBS(Phosphate-Buffered Saline) 또는 IL-33 투여 1일 후 $CD11b^{+}Gr-1^{hi}$, $CD11b^{+}Gr-1^{int}$, $CD11b^{+}Gr-1^{lo}$ 및 $B220^{+}$ 세포 수를 나타내는 그래프이다.

도 2는 IL-33 투여 4일 후 골수 및 혈액 내 단핵구, 다핵형백혈구, 호산구 및 호염구 수 변화를 나타내는 그래프이다.

도 3A는 PBS 또는 IL-33 투여 C57BL/6 마우스의 골수 및 지라 내 CFU-pre-B 콜로니 수를 나타내는 그래프이고, 도 3B는 PBS 또는 IL-33 투여 C57BL/6 마우스의 골수, 지라 및 혈액 내 CFU-M, CFU-G, 및 CFU-GM 콜로니 수를 나타내는 그래프이다.

도 4A는 PBS 또는 IL-33 투여 C57BL/6 마우스의 골수 혈장(plasma) 및 혈청(serum)에서의 시간에 따른 CCL2(MPC-1), CCL7(MCP-3) 과 CCL8(MCP-2)의 수치를 나타낸 그래프이고, 도 4B는 PBS, CCR2 억제제, IL-33 또는 CCR2 억제제와 IL-33 투여 후 C57BL/6 마우스의 비장과 혈액의 유세포분석 결과이고, 도 4C는 PBS, CCR2 억제제, IL-33 또는 CCR2 억제제와 IL-33 투여 후 C57BL/6 마우스의 혈액 내 CFU 콜로니 분석 결과를 나타낸 그래프이고, 도 4D는 PBS 또는 IL-33 투여 C57BL/6 마우스의 골수 혈장 및 혈청에서의 시간에 따른 CXCL1, CXCL2 및 CXCL12의 수치를 나타낸 그래프이다.

도 5A는 PBS 또는 IL-33 투여된 EGFP 형질전환 마우스의 지라세포를 치명적 방사선 조사된 C57BL/6 마우스에 이식시킨 14시간 후, 골수 내 EGFP⁺ LK 및 LKS 세포수를 나타내는 그래프이고, 도 5B는 PBS 또는 IL-33 투여된 Thy1.1 C57BL/6 마우스의 말초혈액단핵세포(peripheral blood mononuclear cell: PBMC)가 치명적 방사선 조사된 Thy1.2 유전자도입 C57BL/6 마우스에 이식된 후 시간에 따른 생존율을 나타낸 그래프이고, 도 5C 내지 도 5E는 PBS 또는 IL-33 투여된 BALB/c 마우스의 지라세포가 치명적 방사선 조사된 동계(同系) 마우스에 이식된 것과 관련된 것으로, 도 5C는 이식 7일 후 골수 및 지라에서의 세포 형성을 나타낸 그래프이고, 도 5D는 이식 7일 후 *C. albicans*를 감염시킨 마우스의 생존율을 나타낸 그래프이고, 도 5E는 *C. albicans*에 감염된 마우스의 여러 기관 내 균질 존재량을 나타낸 그래프이다.

도 6은 이식 7일 후 *C. albicans* 감염 24시간 전 PBS 또는 IL-33을 처리한 BALB/c 마우스에 관한 것으로, 도 6A는 PBS 또는 IL-33 투여 마우스의 감염 후 8일간의 생존율을 나타낸 그래프이고, 도 6B 내지 6D는 *C. albicans* 감염 24시간 후 기관 내 균질 존재량에 관한 것으로, 도 6B는 여러 기관(PEC, Blood, Liver, Spleen, Kidney) 내 균질 존재량을 나타낸 그래프이고, 도 6C는 PMNs 및 Mo/Mac의 수를 나타낸 그래프이고, 도 6D는 혈청 및 복막강 내 CXCL1 및 CXCL2의 수치를 나타낸 그래프이고, 도 6E는 CXCR2⁺ PMN 양을 나타내는 그래프이고, 도 6F는 식세포활성을 나타내는 것으로 FITC-라벨링된 HK *C. albicans* 감염 한 시간 후 PMN의 평균형광강도

(mean fluorescence intensity: MFI)를 나타내는 그래프이다.

도 7은 치사량 방사능 조사된 마우스에 골수세포 이식 후 PBS 또는 IL-33 투여하고 *C. albicans* 투여된 마우스에 관한 것으로, 도 7A는 골수 및 지라 내 분포하는 세포들의 수를 나타내는 그래프이고, 도 7B는 시간에 따른 PBS 또는 IL-33 투여 군들의 *C. albicans* 감염 후 생존율을 나타내는 그래프이고, 도 7C는 각 기관 내 균질 존재량을 나타내는 그래프이고, 도 7D는 FITC⁺ 호중구(neutrophils)의 평균형광강도(MFI)를 나타내는 그래프이고, 도 7E는 FITC⁺ 호중구의 퍼센트를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0021] 본 발명의 IL-33을 포함하는 의약조성물은, 인터류킨-33 또는 인터류킨-33을 코딩하는 유전자를 포함하는 조혈 줄기 및 전구 세포(hematopoietic stem and progenitor cells: HSPC) 동원용 의약 조성물인 것을 특징으로 한다.
- [0022] 본 발명의 IL-33을 포함하는 의약 조성물은 IL-33을 유효성분으로 포함함으로써 HSPC를 말초부 또는 감염 부위로 동원되도록 유도하여 다핵형백혈구를 빠르게 모집하고 다핵형백혈구의 식균 활성을 강화시킴으로써 면역력을 높일 수 있는 것이다.
- [0023] 본 발명에 있어서, 상기 조혈 줄기 및 전구 세포의 동원은 CXCL1, CXCL2, CCL2 및 CCL7로 이루어진 케모카인 군에서 선택되는 적어도 하나 이상의 케모카인의 발현에 의해 유도되는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 의약 조성물에 포함된 IL-33은 CXCL1, CXCL2, CCL2 및/또는 CCL7의 발현을 유도하여 HSPC를 말초부 또는 감염 부위로 동원하게 한다.
- [0024] 본 발명에 있어서, 상기 CXCL1, CXCL2, CCL2 및/또는 CCL7은 혈관세포에서 분비되는 것을 특징으로 한다. IL-33이 투여되면 혈관세포에서 CXCL1, CXCL2, CCL2 및/또는 CCL7을 분비하여 HSPC를 말초부 또는 감염 부위로 동원하게 한다. 상기 혈관세포는 대동맥 혈관 내피 및 평활근 세포일 수 있다.
- [0025] 본 발명의 의약 조성물은 골수 외 조혈작용을 할 수 있도록 한다.
- [0026] 또한, 본 발명의 의약 조성물은 골수에서 골수계 세포(myeloid cell)의 이출을 증진시키는 것을 특징으로 한다.
- [0027] 또한, 본 발명의 의약 조성물은 IL-33이 골수로의 귀향능이 있으므로 장기적으로 면역체계를 재구성할 수 있다.
- [0028] 또한, 본 발명의 의약 조성물은 CXCL1 및 CXCL2 분비를 증진시키고 호중구에 대한 CXCR2의 더 높은 발현에 의하여 감염 부위로 다핵형백혈구를 빠르게 모집하고 다핵형백혈구의 식균 활성을 강화시켜 우수한 항진균 효과를 갖는다.
- [0029] 본 발명의 의약 조성물은 조혈 줄기 세포 이식을 위한 HSPC 획득에 이용될 수 있다.
- [0030] 따라서 본 발명의 HSPC 동원용 의약 조성물은 IL-33의 기작에 의거 소망하는 목적을 달성할 수 있다.
- [0031] IL-33의 타겟 세포는 혈관세포이며 이는 HSPC 동원의 동인(動因)이 된다. 이는 다음에서 확인할 수 있다: 첫째, IL-33 투여는 골수 혈장(plasma)과 비교하였을 때 혈청 내 CCL2 및 CCL7의 수치를 증가시킨다(도 4A). 둘째, IL-33 투여는 비장과 혈액 내 조혈 줄기 및 전구 세포의 수를 증가시킨다(도 4B). 셋째, IL-33 처리 마우스는 CCR2-의존 방식으로 혈액 내 CFU 콜로니수를 증가시킨다(도 4C). 또한, IL-33 투여는 골수 혈장과 비교하였을 때 혈청 내 CXCL1 및 CXCL2의 수치를 빠르게 증가시킨다(도 4A).
- [0032] 본 발명의 의약조성물은 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 뉴모시스티스 무리나(*Pneumocystis murina*) 또는 니포스트론질러스 브라질리엔시스(*Nippostrongylus brasiliensis*)에 대하여 항균 활성을 갖는 것을 특징으로 한다.
- [0033] IL-33은 염증과 같은 신체 스트레스 상태에서 빠르게 면역시스템을 재구성할 수 있다. 또한 기회감염성 균(예, *C. albicans*) 감염에 대한 기주를 보호하는 기능적 HSPC의 동원을 유도할 수 있다. 또한, IL-33은 자가조직 조혈 줄기 세포 이식(hematopoietic stem cell transplantation: HSCT)을 수여받은 마우스에서 강한 항진균성을 나타낸다.
- [0034] 한편, IL-33의 항진균 활성은 진균 감염에 대한 선천적 면역 반응의 다중 단계를 포함한다. 첫째, IL-33은 정주(resident) 대식세포(macrophages)를 민감하게 하여 CXCL1과 CXCL2를 생성함으로써 감염 부위에 PMN을 모이게

한다(도 6C). 둘째, IL-33은 CXCR2의 하향-조절(down-regulation)을 막음으로써 PMN 모집을 증진시킨다. 셋째, IL-33은 PMN의 식균 활성을 직접적으로 강화시킨다(도 6F). 나아가, IL-33은 내피 세포의 투과성(permeability)을 증가시킴으로써 PMN의 분출(extravasation)을 강화시킬 수 있다.

[0035] IL-33은 공동작용 방식(coordinated fashion)으로 급성 염증 현상을 지지한다. 골수에서, IL-33은 골수혈구 형성(myelopoiesis)의 증진과 림프구 형성(lymphogenesis)의 억제를 통하여 충분한 염증 세포의 숫자를 위한 요구를 만족시킬 수 있다. IL-33 처리에 따른 HSPC의 활발한 이동(emigration)에도 불구하고, 림프계가 아닌 골수계 전구체의 빈도가 골수 내에 유지되는 것은 IL-33이 어떻게 골수 내에서 골수혈구 형성을 증진시키고 림프구 형성을 억제하는지를 설명할 수 있다. 혈관에서, IL-33은 혈관세포에 의해 CXCL1, CXCL2, CCL2 및/또는 CCL7의 방출을 자극하고, 이어 말초로 HSPC 동원을 유도한다. IL-33은 또한 단핵구와 다른 과립구(granulocytes)를 골수에서 혈액으로의 이동을 유도한다(도 2). 복막에서, IL-33이 복막 대식세포를 민감하게 하여 *C. albicans* 감염에 대한 반응으로 CXCL1 및 CXCL2를 생성하는 것은, IL-33이 혈액에서 기관들로 PMN 동원을 유도할 수 있음을 시사하는 것이다. 즉, IL-33이 PMN의 식균 활성을 강화시킨다는 것은 IL-33이 염증의 작용(effector phase)을 조절한다는 것을 의미한다.

[0036] 본 발명의 의약조성물은 조혈 줄기 및 전구 세포를 동원하거나 또는 항진균 활성을 나타내는데 치료학적으로 유효한 양의 인터류킨-33이 포함된다. 바람직하게는 의약조성물 총중량에 대하여 0.001 내지 5.0 중량%의 인터류킨-33이 포함된다. 보다 바람직한 양은 0.01 내지 0.1 중량%이다.

[0037] 본 발명의 의약조성물은 유효성분인 IL-33 이외 당업계의 공지된 담체 및 희석제와 함께 적절한 제형으로 투여될 수 있다. 또한, 목적하는 방법에 따라 비경구투여, 예를 들면, 정맥 내 주사, 근육 내 주사, 복강 내 주사, 피하주사, 좌제 등의 제형으로 투여될 수 있다. 본 발명의 의약조성물이 경구로 투여될 때는 정제, 캡슐, 입자, 분말, 환제, 현탁제, 유화제 또는 시럽 등의 제형으로 투여될 수 있다.

[0038] 상기 제형들은 의약조성물에 통상적으로 사용되는 적당한 부형제, 충전물, 결합제, 습윤제, 분해제, 윤활제, 계면활성제, 분산제, 완충액, 방부제, 용해보조제, 소독제, 감미료, 향신료, 진통제, 안정화제, 등장액제 등을 이용한 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0039] 상기 기술된 각각의 제형은 약학적으로 허용되는 담체 또는 첨가제를 포함할 수 있다. "약학적으로 허용되는"이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증 등과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다. 상기 담체 또는 첨가제의 구체적인 예로는 물, 약학적으로 허용되는 유기용매, 콜라겐, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐피롤리돈, 카복시비닐 중합체, 알긴산 나트륨, 수용성 텍스트란, 카복시메틸 나트륨 녹말, 펙틴, 잔탄 고무, 아라비아 고무, 카제인, 젤라틴, 한천, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸글리콜, 바셀린, 파라핀, 스테아릴 알코올, 스테아린산, 인간 혈청 알부민, 만니톨, 소비톨 및 젖산 등이 있다. 한 개 또는 그 이상의 첨가제가 조제 형태에 따라 선택되거나 또는 적절히 조합될 수 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).

[0040] 더 나아가, 유전자요법 치료제 투여방법으로는, 정맥내, 동맥내 투여와 같은 통상적인 전신투여 이외에 표적 세포로의 국소적 투여가 행해질 수 있으며, 카테터 기술 및 외과적 수술과 조합된 투여 방법이 사용될 수 있다.

[0041] 상기 "치료학적으로 유효한 양(therapeutically effective amount)"이란 연구자, 의사, 또는 기타 임상에서 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 유효 성분 또는 약학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양을 포함한다. 따라서 최적의 함량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 포함하는 것이 중요하다.

[0042] 또한, 본 발명은 포유동물에게 치료상 유효량의 본 발명의 의약조성물을 포함하는 미생물 감염 질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[0043] 이때, 상기 "포유동물"은 치료, 관찰 또는 실험의 대상인 포유동물을 말하며, 바람직하게는 인간을 말한다.

[0044] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설

명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0045] <재료 및 방법>

[0046] 1. 마우스 및 시약

[0047] 6-8 주령된 암컷 C57BL/6 및 BALB/c 마우스를 Orient(서울, 대한민국)에서 구입하였다. MyD88^{-/-}, GFP 형질전환된(transgenic), 및 Thy1.1 유전자도입된(congenic) C57BL/6 마우스를 잭슨연구소(Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME)에서 구입하고 울산대학교 동물시설에서 무병원균 조건하에서 키웠다. 울산대학교 동물보호위원회가 본 연구를 승인하였다. non-peptide CCR2 antagonist RS504393(TOCRIS bioscience, Park Ellisville, MO)

[0048] 2. 재조합 IL-33 단백질 제조

[0049] 재조합 IL-33 단백질은 문헌[Schmitz, J., A. Owyang, E. Oldham, Y. Song, E. Murphy, T. K. McClanahan, G. Zurawski, M. Moshrefi, J. Qin, X. Li, D. M. Gorman, J. F. Bazan, and R. A. Kastelein. 2005. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 23: 479-490]에 기재된 대로 제조하였다.

[0050] 3. 말초혈액세포 동원 및 조혈 줄기 세포 이식

[0051] HSPC 동원을 유도하기 위하여, 마우스에 재조합 IL-33을 투여하였다(1ug/mouse/d, 매일, 4회 분할 투여). PBS(Phosphate-Buffered Saline)가 대조구(control)로 사용되었다. 최종 투여 후 마우스가 죽으면 지라세포를 취하고, 5×10^6 지라세포를 치사량으로 방사선 조사된(9 Gray) 마우스에 정맥투여로 이식하였다.

[0052] 4. 유동세포분석(Flow cytometry)

[0053] 마우스의 단백질에 FITC-, PE-, PE-Cy5(PE-cytochrome 5), PerCP- 또는 APC(allophycocyanin)-결합된(conjugated) mAbs는 BD Biosciences(San Diego, CA) 또는 e-Bioscience(San Diego, CA)에서 구입하였고 세포 염색(cell staining)을 위하여 사용되었다: B220, CD3, CD19, CD11b, CD11c, CD49d, CD115(IL-7R α), c-Kit, CXCR2, CXCR4, Fc ϵ RI α , F4/80, Gr-1, Ly6G, Sca71, Ter119 및 Thy1.1. 정제된 세포를 블록킹 버퍼(2.4G2 mAbs/0.2% BSA/0.1% 소듐 아자이드 함유 PBS) 내에서 사전 배양한 후, 4°C에서 30분 동안 적의 mAbs로 배양하고, 염색 버퍼(staining buffer)로 두 번 세척하였다. 유동세포 분석은 FACSCanto II(BD Biosciences, San Jose, CA) 세포측정기(cytometer)를 이용하여 수행하였고, 데이터는 FACS Diva software(BD Biosciences)와 FlowJo software(Tree Star, Inc., Ashland, OR)를 이용하여 분석하였다.

[0054] 5. 혈액세포 카운팅(Blood cell counts)

[0055] 연속 4일 동안 PBS 또는 1ug IL-33을 마우스에 투여하였다. 마지막 투여한 날, 혈액을 채취하고, Hemavet Moscot hematology analyzer(CDC Technologies, Oxford, CT)를 이용하여 백혈구를 카운팅하였다.

[0056] 6. 콜로니 형성 검정(Colony forming assay)

[0057] 콜로니 형성 검정을 제조자 권고서(StemCell Technologies, Vancouver, Canada)에 따라 수행하였다. 간략히 설명하면, 골수세포, 지라세포, PBMC가 2×10^5 cells/well의 밀도로 플레이팅되었다. 상기 배양액을 사이토카인 콕테일 함유 MethoCult M3534 완전 배지(complete medium) 내에서 37°C에서 배양하고, CFU-과립구-단핵백혈구(CFU-granulocyte-monocyte, CFU-GM), CFU-G 및 CFU-M의 콜로니 수를 지시된 시간에 카운팅하였다. CFU-pre-B를 카운팅하기 위해, 골수세포와 지라세포(2×10^5 cells/well)를 IL-7(StemCell Technologies) 함유 MethoCult M3630 배지에서 배양하였다.

[0058] 7. 귀향 검정(Homing assay)

[0059] IL-33 동원 HSPCs의 귀향능(homing capacity) 실험을 위하여, PBS 또는 IL-33 투여된 GFP⁺ 또는 Thy1.1 유전자 도입 C57BL/6 마우스 1 X 10⁷ 지라세포를 Th1.2 c C57BL/6 수여 마우스에 이식하였다. 이식 14시간 후 골수 내에 있는 도너-유래(donor-derived) LK(lin⁻c-Kit⁺) 또는 LKS(lin⁻c-Kit⁺Sca-1⁺) 세포를 유세포 분석기를 이용하여 열거하였다.

[0060] 8. ELISA

[0061] 제조자 지시서(BioLegend, SanDiego, CA, PEPROTECH, RockyHill, NJ 및 R&D Systems, Minneapolis, MN)에 따라 ELISA를 이용하여 혈청 및 골수 혈장 CCL2, CCL7, CXCL1, CXCL2 및 CXCL12 수치를 결정하였다.

[0062] 9. 칸디다 알비칸스 감염(*C. albicans* infection)

[0063] 조혈줄기세포 이식 후 7일 지난 마우스 복막에 *C. albicans*(ATCC 26555) 치사량(0.5-3 X 10⁷ CFUs)을 투여하였다. 칸디다 존재량(candidal Burden)을 확인하기 위해 조혈줄기세포 이식 7일 후, 치사량에 가까운 양의 *C. albicans*(2 X 10⁶ CFUs)를 투여하였다. 상기 주입 24시간 후 기관들을 채취하고 PBS 내에서 기계적 붕괴로 균질화시켰다. 순차적 희석액들(serial dilutions)을 사부로 배지(Sabouraud agar)에 플레이트팅하여 37°C에서 24시간 동안 배양시켰다. 콜로니를 카운트하고 logCFU/mL 또는 logCFU/organ으로 나타내었다.

[0064] 10. 식균작용 검정(Phagocytosis assay)

[0065] FITC-라벨링된 가열-사멸된(heat-killed, HK) *C. albicans* 2 X 10⁸를 복강 내 주입하고 1시간 후 생체내(in vivo) 식균작용을 분석하였다. 차가운 PBS 3ml로 복막관류법(Peritoneal lavage)을 수행하고, 채취된 세포를 얼음 위에서 지시된 Abs로 염색시켰다. 차가운 FACS 버퍼로 두 번 세척 후, 상기 염색된 세포를 0.04% 트리판 블루(trypan blue)와 1% 포르말데히드 함유 퀀칭 용액(quenching solution)으로 퀀칭시켜 세포의 형광(extracellular fluorescence)을 배제하였다. FACS Canto II를 이용하여 FITC-라벨링된 *C. albicans*의 PMNs(CD11b⁺Ly6G^{hi})에 의한 세포 식균작용을 분석하였다. 식균작용의 정도는 평균형광강도(mean fluorescence intensity, MFI) 또는 FITC-라벨링된 *C. albicans*를 식균작용한 호중구의 퍼센트로 나타내었다.

[0066] 11. 통계학적 분석(Statistical analysis)

[0067] 모든 데이터는 GraphPad Prism Software version 4를 이용하여 분석되었다. Unpaired Student's t tests를 이용하여 그룹 간 차이를 비교하였다. log-rank test와 Mann-Whitney U test를 이용하여 생존율 곡선 및 진균 총수(fungal count)를 각각 분석하였다. 에러 바(error bar)는 표본평균의 표준오차를 나타낸다. *P* < 0.05 값을 통계적으로 중요한 것으로 생각하였다.

[0068] <실시예 1> IL-33의 MyD88-의존적 골수혈구 형성 증진

[0069] IL-33 1 ug을 4일 동안 C57BL/6 마우스에 투여하였다. 골수 및 지라에서 CD11b⁺Gr-1^{hi}, CD11b⁺Gr-1^{int}, CD11b⁺Gr-1^{lo} 및 B220⁺ 세포의 수를 지정된 시점에 측정하였다(도 1A). 결과는 5차례 시험하여 평균±SEM(n = 4/group/time)으로 나타내었다. *, *p* < 0.05; **, *p* < 0.01; ***, *p* < 0.001.

[0070] 야생형 MyD88-결여 C57BL/6 마우스에 IL-33 또는 PBS를 4일 동안 투여하였다. 마지막 투여 1일 후에 골수 및 지라에서 CD11b⁺Gr-1^{hi}, CD11b⁺Gr-1^{int}, CD11b⁺Gr-1^{lo} 및 B220⁺ 세포의 수를 측정하였다(도 1B). 결과는 두 차례 시험

하여 평균±SEM(n = 2-4/group)으로 나타내었다. *, p < 0.05; **, p < 0.01.

[0071] 도 1A에 도시되어 있는 바와 같이, 4일 연속 IL-33을 주입한 마우스는 골수 내 CD11b⁺Gr-1^{hi} 및 B220⁺ 세포 수가 일시적으로 뚜렷하게 감소함을 나타내었고 CD11b⁺Gr-1^{int/lo} 세포 수는 증가함을 나타내었다. 골수 내 CD11b⁺Gr-1^{hi} 세포 수의 감소는 PMN의 빠른 이출로 인한 것이다. 또한 총 지라세포의 수가 증가되었다.

[0072] 도 1B에 도시되어 있는 바와 같이, MyD88-결여 C57BL/6 마우스의 골수 및 지라에서는 도 1A에서와 같은 조혈세포의 변화를 나타내지 않았다.

[0073] 따라서, IL-33이 MyD88-의존적으로 골수혈구 형성을 증진시킴을 확인할 수 있었고, IL-33이 골수와 지라에서 골수혈구 형성과 림프구 생성을 다르게 조절한다는 것을 확인할 수 있었다.

[0074] <실시예 2> IL-33의 골수계 세포 이출(emigration) 증진

[0075] 투여 4일 후, 유세포분석기(flow cytometry)를 이용하여 C57BL/6 마우스의 골수 내 단핵구(CD11b⁺CD115⁺), PMN(CD11b⁺Gr-1^{hi}SSC^{int}), 호산구(CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C⁺F4/80⁺) 및 호염구(CD11b⁺CD49d⁺c-Kit⁺FcεRI⁺)를 분석하고, Hemavet Moscot hematology analyzer를 이용하여 혈액 백혈구(blood leukocytes)를 분석하였다. 결과는 독립된 3차례 시험하여 평균±SEM(n = 4-9 per group)으로 나타내었으며 그 결과를 도 2에 도시하였다. ***, p < 0.001.

[0076] 도 2에 도시되어 있는 바와 같이, 골수에서 CD11b⁺Gr-1^{hi}SSC^{int} PMN의 수만이 감소하였고 CD11b⁺F4/80⁺ 단핵구(monocytes), CD11b⁺CD49d⁺c-Kit⁺FcεRI⁺ 호염구(basophils), 및 CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C⁺F4/80⁺ 호산구(eosinophils)의 수가 뚜렷하게 증가하였으며, 또한 말초혈액에서 단핵구, PMN, 호염구 및 호산구의 수가 모두 증가하였다.

[0077] 따라서, IL-33 처리가 단핵구, 호염구 및 호산구의 생성을 증진시키고, 이어 다른 속도로 골수에서 이출됨을 알 수 있고, 또한 PMN의 경우에는 IL-33 처리에 따라 PMN가 골수 내에서 생성되기 전 대량의 PMNs가 이출됨을 알 수 있다.

[0078] <실시예 3> IL-33의 HSPC 동원 유도

[0079] PBS 또는 IL-33을 투여한 C57BL/6 마우스의 골수세포, 지라세포 또는 PBMC를 채취하여 콜로니 형성 검정을 실시하였다. 16 내지 18일 동안 배양된 지라세포 및 골수세포에서 CFU-pre-B 콜로니를 각각 카운팅하였다(도 3A). 골수세포(5일), 지라세포(5일) 또는 PBMC(7일) 배양액에서 CFU-GM, CFU-G 및 CFU-M 콜로니를 측정하였다(도 3B). 결과는 두 차례 이상 시험하여 평균±SEM(n = 4-10 per group)으로 나타내었다. *, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001.

[0080] 도 3A 및 도 3B에 도시되어 있는 바와 같이, IL-33 처리 마우스의 골수 내 CFU-pre-B 콜로니 수가 PBS 처리 마우스의 골수 내 CFU-pre-B 콜로니 수 보다 월등히 적었으나, CFU-M, CFU-G, 및 CFU-GM 콜로니 수에는 큰 차이가 없었다. 한편, IL-33 처리 마우스의 지라 내 CFU-pre-B 콜로니 수는 PBS 처리 마우스의 지라 내 CFU-pre-B 콜로니 수 보다 월등히 많았고, 또한 CFU-M, CFU-G, 및 CFU-GM 콜로니 수에 있어서도 IL-33 처리 마우스가 월등하였다. 나아가 말초혈액 내에서도 IL-33 처리 마우스의 CFU-M, CFU-G, 및 CFU-GM 콜로니 수가 PBS 처리 마우스에 비하여 월등히 많았다.

[0081] 따라서, IL-33의 처리가 지라 내에서 골수계 세포와 림프구(lymphocytes)를 확장시키는데 효과가 있으며 IL-33이 HSPC 동원을 유도하여 골수외에서 조혈작용(extramedullary hematopoiesis) 할 수 있음을 나타낸다. 또한, 골수 내 림프구 생성에 대한 IL-33의 억제 효과는 림프계 전구세포의 대규모 이출 때문임을 알 수 있다.

[0082] <실시예 4> CCL2과 CCL7 의존적 IL-33-유도 HSPC 동원

[0083] PBS 또는 IL-33 투여 후 시간당으로 C57BL/6 마우스의 골수 혈장 및 혈청에서의 CCL2 및 CCL7의 수치를 측정하였다(도 4A). 결과는 두 차례 시험하여 평균±SEM(n = 4 per group)으로 나타내었다. *, p < 0.05; **, p <

0.01, ***, $p < 0.001$.

- [0084] PBS 또는 IL-33 투여 후 C57BL/6 마우스 비장과 혈액 내에서 유세포분석기를 이용하여 조혈 줄기 및 전구 세포를 분석하였다(도 4B). 혈액 내에서 IL-33 투여 후 혈액에서 세포를 분리하여 CFU 콜로니 배양 5일 후 콜로니수를 계산하였다(도 4C). 결과는 평균±SEM($n = 4-6$ per group)으로 나타내었다.***, $p < 0.001$.
- [0085] PBS 또는 IL-33 투여 후 시간당으로 C57BL/6 마우스의 골수 혈장 및 혈청에서의 CXCL1, CXCL2 및 CXCL12의 수치를 측정하였다(도 4D). 결과는 두 차례 시험하여 평균±SEM($n = 4$ per group)으로 나타내었다. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$.
- [0086] 도 4A에 도시되어 있는 바와 같이, IL-33 투여 4일 후 CCL2(MPC-1)의 수치를 조사했을 때 골수에서는 변화가 없었지만 혈청에서 증가하였고, CCL7(MPC-3)은 골수와 혈청에서 모두 증가하였다.
- [0087] 도 4B에 도시되어 있는 바와 같이, IL-33 처리 마우스의 비장과 혈액 내에서 LKS^+ , LKS^- 및 CLP 세포의 수가 증가하였다. 또한 도 4C에 도시되어 있는 바와 같이 IL-33 처리 마우스의 혈액 내 CFU 콜로니의 수가 증가하였고 CCR2 억제제 RS504393은 혈액 내 CFU 콜로니수의 증가를 상당히 억제하였다.
- [0088] 따라서, IL-33이 CCR2-의존 방식으로 HSPC 동원을 유도하였다는 것을 알 수 있다.
- [0089] 또한, 도 4D에 도시되어 있는 바와 같이, IL-33 투여 1시간 후 혈청에서 CXCL1의 수치가 급격히 증가하였고 그 후 느리게 감소하였다. 또한 CXCL2도 CXCL1 만큼은 아니나 혈청에서 CXCL1과 유사한 패턴을 보였다. 한편, 골수에서 CXCL1 및 CXCL2의 수치에는 변화가 없었고, IL-33의 투여가 혈청뿐 아니라 골수 내 CXCL12의 수치에는 어떤 변화도 유도하지 않았다.
- [0090] <실시예 5> IL-33-동원 HSPC 수여된 마우스 내 항균 활성
- [0091] PBS 또는 IL-33 투여된 EGFP 형질전환 마우스의 지라세포를 치명적 방사선 조사된 C57BL/6 마우스에 이식하였다. 이식 14시간 후, 골수 내 $EGFP^+$ LK 및 LKS 세포수를 측정하였다(도 5A). 결과는 4차례 시험하여 평균±SEM($n = 5$ per group)으로 나타내었다. *, $p < 0.05$.
- [0092] PBS 또는 IL-33 투여 Thy1.1 C57BL/6 마우스의 PBMC(1×10^5 cells/mouse)를 치명적 방사선 조사된 Thy1.2 유전자도입 C57BL/6 마우스에 이식하였다. 도 5B에 Kaplan-Meier 생존율 곡선을 도시하였다. ***, $p < 0.007$ ($n = 10$ per group).
- [0093] 5×10^6 PBS 또는 IL-33 투여된 BALB/c 마우스의 지라세포를 치명적 방사선 조사된 동계(同系) 마우스에 이식하였다. 이식 7일 후 FACS를 이용하여 골수 및 지라에서 세포들을 분석하였다(도 5C). 이식 7일 후 일부 마우스에 *C. albicans*(5×10^6 CFUs)를 투여하고 7일 동안 12시간 마다 생존율을 체크하였다(도 5D). 또한 이식 7일 후 *C. albicans*에 감염된 마우스의 기관을 채취하여 균질 존재량을 측정하였다(도 5E). 데이터는 logCFU/ml 또는 logCFU/organ으로 나타내었다. 결과는 두 차례 시험하여 평균±SEM($n = 5$ per group)으로 나타내었다. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.
- [0094] 도 5A에 도시되어 있는 바와 같이, 지라세포 이식 14시간 후, 방사능 조사된 수여 마우스의 골수 내에 도너(donor)인 EGFP 형질전환 마우스의 GFP^+ LK 및 LKS 세포가 뚜렷하게 존재하였다. 이는 IL-33-동원 HSPCs가 정상적인 귀향능(homing capacity)이 있음을 나타내는 것이다. 또한, IL-33-투여 마우스 세포가 이식된 마우스가 PBS-투여 마우스 세포 이식된 마우스 보다 도너 LK 및 LKS 세포를 더 많이 갖고 있었다.
- [0095] 도 5B에 도시되어 있는 바와 같이, IL-33 투여 마우스의 PBMC를 이식받은 마우스는 시험 종료까지(PBMC 이식 후 9개월) 대부분 살아 있는 반면, PBS-투여 PBMC를 이식받은 마우스들은 이식 후 20일 이내에 모두 죽었다. 이는 IL-33-동원 HSPC가 귀향할 수 있으며 방사선 조사 수여 마우스의 골수 내에서 장기간 재분화(long-term reconstitution)할 수 있음을 나타낸다.
- [0096] 도 5C에 도시되어 있는 바와 같이, PBS-동원 HSPC에 비하여 IL-33-동원 HSPC를 이식받은 마우스의 BM에서 $CD11b^+Ly6G^{hi}$ PMNs, $CD11b^+F4/80^+$ 단핵구, $CD11b^+SiglecF^+$ 호산구, $CD3^+$ T 세포, 및 B220⁺ B 세포의 수가 뚜렷하게 많았다. 동시에, PBS-동원 HSPCs 수여받은 마우스와 비교하여 IL-33-동원 HSPCs 수여받은 마우스의 지라가

또한 PMNs, 단핵구와 호산구의 상당히 많은 수를 포함하였다. 2 그룹 간에 지라 내 림프구의 수에는 차이가 없었다. 따라서, 방사능 조사된 마우스에서 IL-33 동원 HSPC에서 유래된 면역세포가 빠르게 생성됨을 확인할 수 있었다.

[0097] 도 5D에 도시되어 있는 바와 같이, 감염 후 IL-33-동원 HSPC 이식 마우스가 PBS-동원 HSPC 이식 마우스에 비하여 월등히 더 높은 생존율을 보였다.

[0098] 도 5E에 도시되어 있는 바와 같이, IL-33-동원 HSPC 이식 마우스의 여러 기관(PEC, Blood, Liver, Spleen, Kidney) 내 균질 존재량이 PBS-동원 HSPC 이식 마우스에 비하여 훨씬 낮았다. 즉, 마우스의 높은 생존율은 다양한 기관 내 *C. albicans*의 더 적은 수와 상호연관성 있음을 알 수 있다. 따라서 IL-33-동원 HSPC가 면역 체구성에 충분히 기능하고 그 후대가 *C. albicans* 감염에 보호 역할을 한다는 것을 확인하였다.

[0099] <실시예 6> IL-33-동원 HSPC 이식 후 추후 IL-33 처리의 항균 활성 증진

[0100] 이식 6일 된 BABL/c 마우스에 IL-33(1 ug)을 투여하고 24시간 후에 *C. albicans*(8×10^6 CFUs)를 투여하여 감염시켰다. 감염 후 8일 동안 생존율을 체크하였다(도 6A). *C. albicans*(5×10^6 CFUs) 감염 24시간 후 여러 기관(PEC, Blood, Liver, Spleen, Kidney) 내 균질 존재량을 측정하였다(도 6B). 복막관류법을 시행하여 감염 11시간 후 혈청을 채취하였다. FACS를 이용하여 복막 PMN(도 6C) 및 대식세포의 수 및 PMN에 발현된 CXCR2(도 6E)를 분석하였다. ELISA를 이용하여 혈청 및 복막강 내 CXCL1 및 CXCL2의 수치를 측정하였다(도 6D). FITC-라벨링된 HK *C. albicans*(2×10^8 CFUs) 감염 1시간 후 PMN(CD11b⁺Ly6G^{hi})의 평균형광강도(MFI)로 식균작용을 분석하였다(도 6F) 결과는 평균±SEM(n = 15~18 per group)으로 나타내었다. *, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001.

[0101] 도 6A에 도시되어 있는 바와 같이, PBS 투여 마우스에 비하여 IL-33 투여 마우스가 치사량의 *C. albicans*(8×10^6 CFUs) 감염에 대하여 높은 생존율을 나타내었다. 이는 도 6B에 도시된, 감염 24시간 후 여러 기관(PEC, Blood, Liver, Spleen, Kidney) 내 균질 존재량의 결과와 일치하였다. 또한 도 6C에 도시되어 있는 바와 같이, IL-33 수여 마우스는 PMN 수가 증가되었으며 이는 감염 부위로 PMN가 신속히 모집되었음을 의미한다. 또한 도 6D에 도시되어 있는 바와 같이, 복막강(peritoneal cavity) 및 혈액 내 CXCL1 및 CXCL2의 수치가 증가하였고, 도 6E에 도시되어 있는 바와 같이, 복막(peritoneum) 내 CXCR2⁺ PMNs 수가 증가하였다. 나아가 도 6F에 도시되어 있는 바와 같이, IL-33-민감화된(sensitized) PMN는 PBS-민감화된 PMN보다 *C. albicans* 식균작용에 훨씬 활동적이었다.

[0102] 이는 IL-33이 *C. albicans* 감염에 대한 PMN의 반응성(responsiveness)을 증가시키도록 작용함을 나타낸다.

[0103] <실시예 7> IL-33의 *C. albicans* 감염으로부터 자가조직 골수이식 마우스의 보호

[0104] 치사량 방사능 조사된 BALB/c 마우스에 5×10^6 BALB/c 골수세포를 이식하였다. 이식 후 5일과 6일째 두 번 IL-33(1 ug)을 투여하고 이식 후 7일째에 복강내로 *C. albicans*를 주입하였다. 7일째에 골수 및 지라에 분포하는 세포들을 분석하였다(도 7A). 골수세포 이식 후 지정된 시간에 마우스에 IL-33을 투여하고 골수이식 7일 후 *C. albicans*(3×10^7 CFU)를 주입하고 7일 동안 생존율을 체크하였다(도 7B). 골수세포 이식 후 5일과 6일째 마우스에 IL-33을 투여하고 *C. albicans*(1×10^7 CFU) 주입 24시간 후 각 기관 내 균질 존재량을 측정하였다(도 7C).

[0105] 자가조직 골수세포를 이식한 마우스에 이식 후 5일과 6일째 두 번 IL-33(1 ug)을 투여하고, FITC-라벨링된 HK *C. albicans*(2×10^8 CFU)를 주입하였다. 1시간 후, PMNs(CD11b⁺Ly6G^{hi})의 평균형광강도(MFI)로 식균작용을 분석하였다. 식균작용은 FITC⁺ 호중구의 평균형광강도(MFI)(도 7D) 또는 FITC⁺ 호중구의 퍼센트(도 7E)로 나타내었다. 결과는 평균±SEM(n = 5~7 per group)으로 나타내었다. *, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001.

[0106] 도 7A에 도시되어 있는 바와 같이, *C. albicans* 감염 전 IL-33의 2일 투여는 BM 내 호산구가 2배 증가한 것을

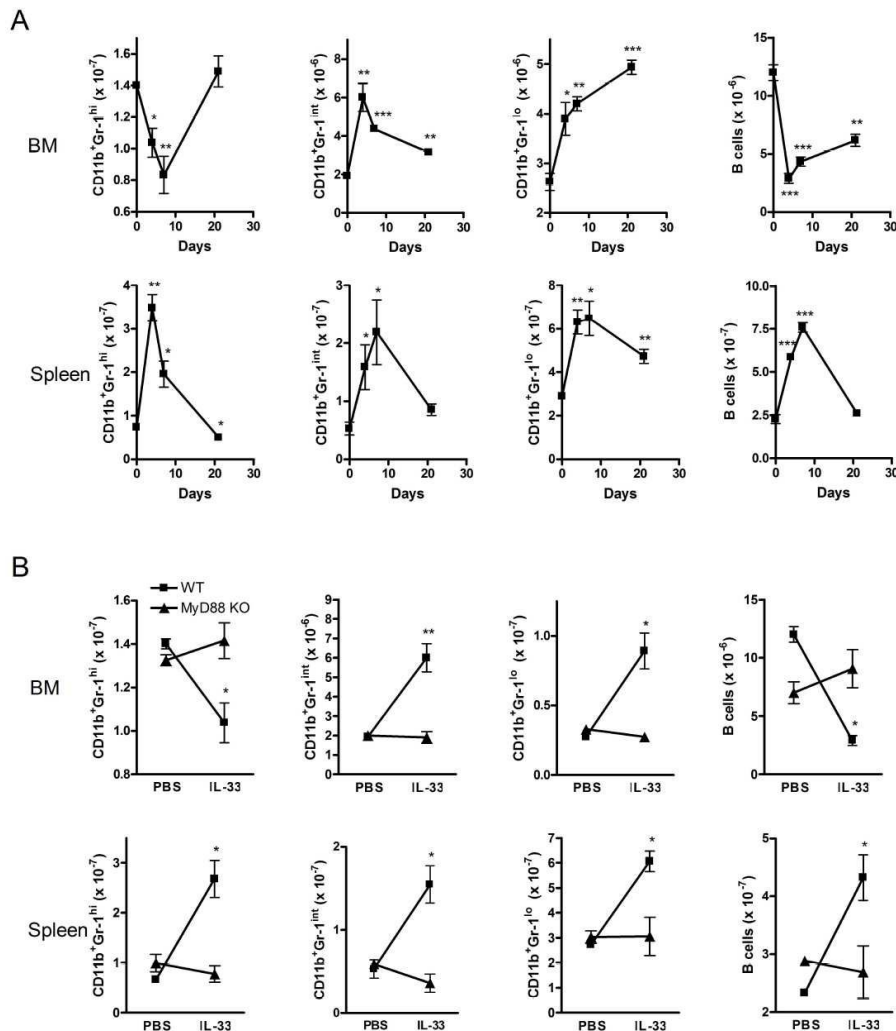
제외하면 BM 및 지라 내 골수계 세포와 림프구의 수에 영향을 미치지 않았다. 그러나 IL-33은 치사량의 *C. albicans*(3.3×10^7 CFUs)가 투여된 마우스의 생존율을 증가시켰다(도 7B). 도 7C에 도시되어 있는 바와 같이, 감염 24시간 전 IL-33의 투여가 여러 기관들 내 균질 존재량을 상당량 감소시켰다. 또한 IL-33의 투여가 PMN의 식균 활성을 강화시킴을 확인할 수 있었다(도 7D 및 7E).

[0107] 따라서, IL-33이 자가조직 골수이식 후 *C. albicans* 감염에 대해 보호적 역할을 함을 알 수 있다.

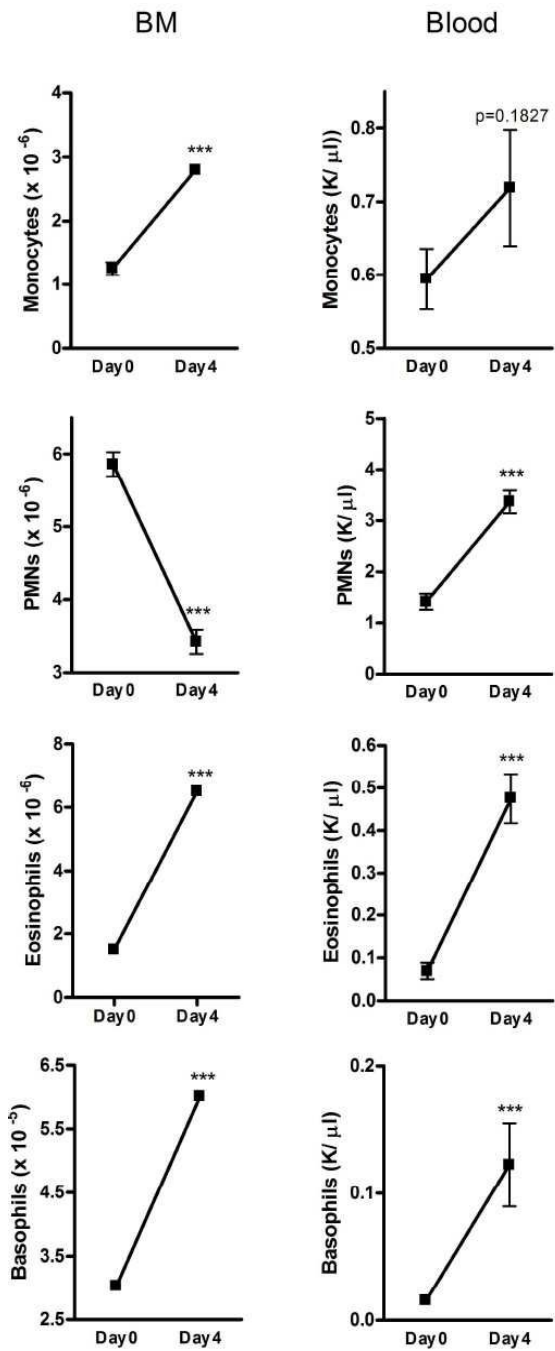
[0108] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

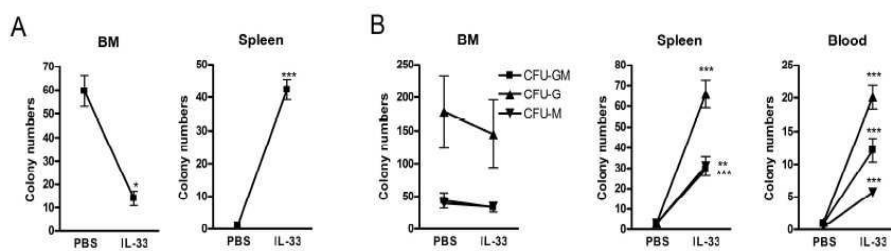
도면1



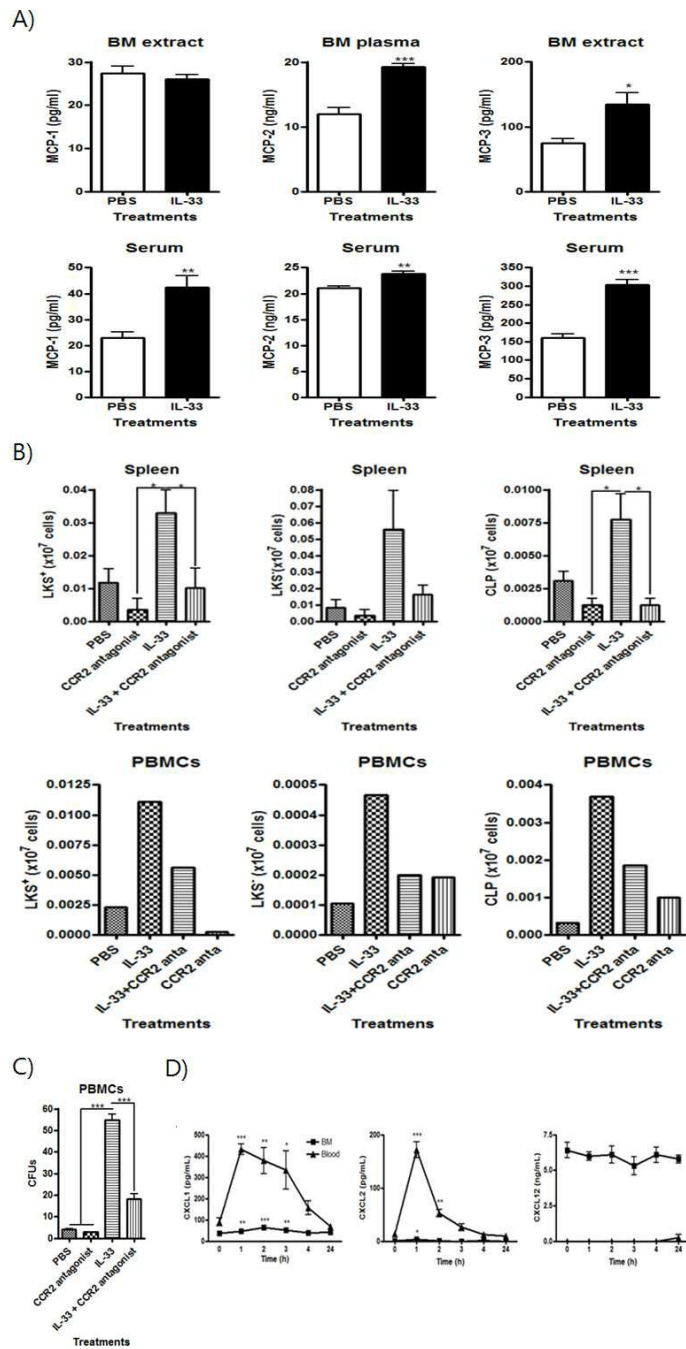
도면2



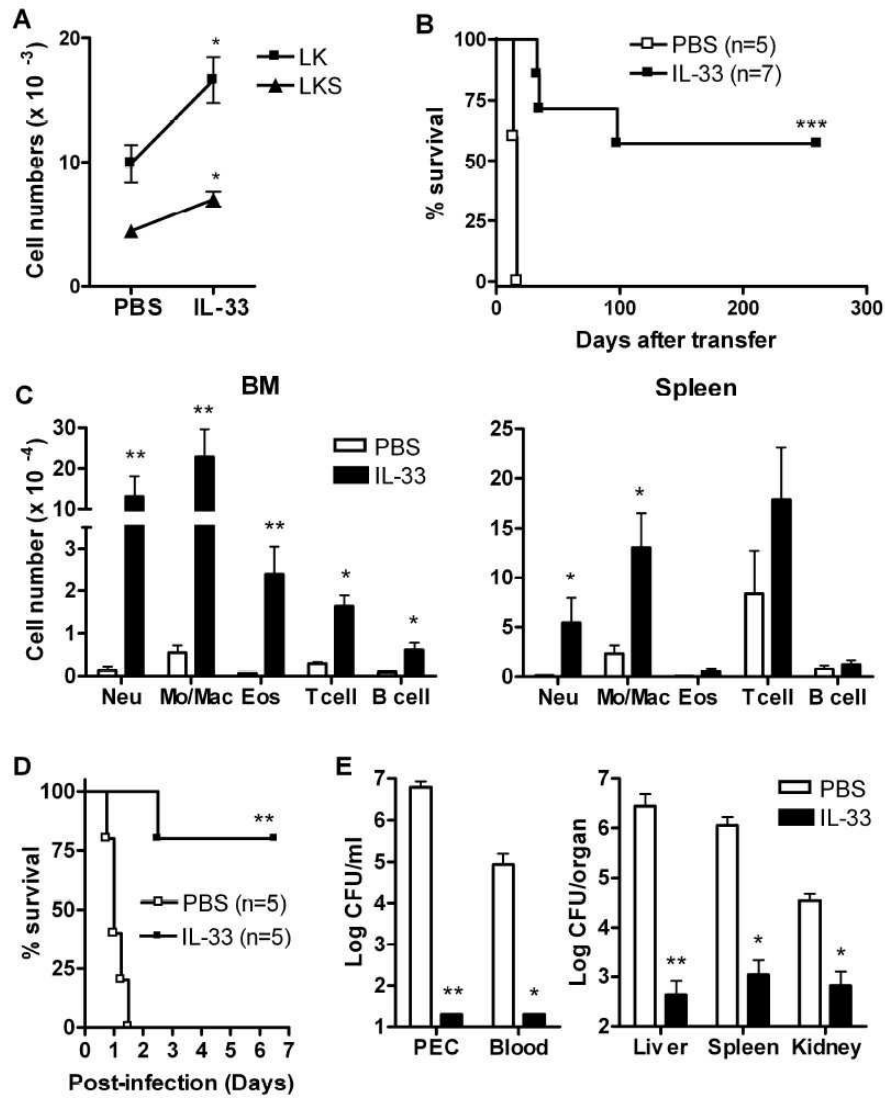
도면3



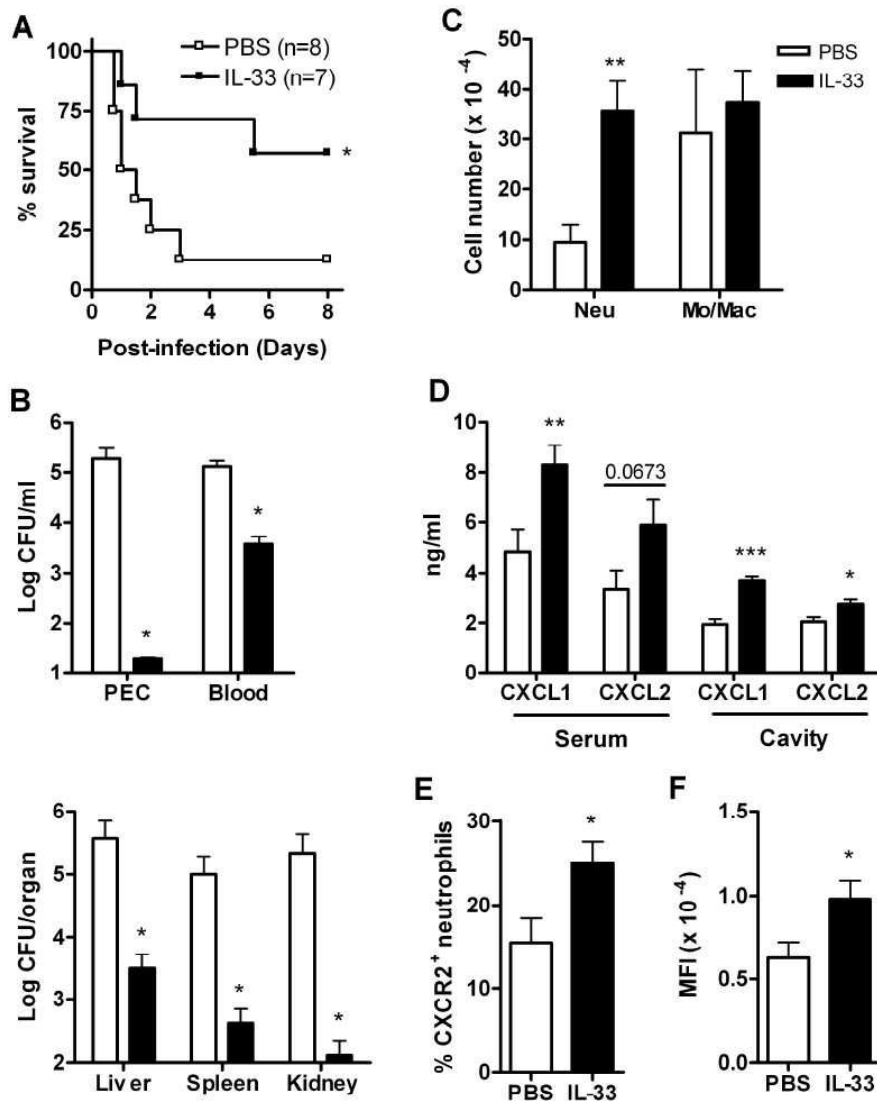
도면4



도면5



도면6



도면7

