(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0124963
(43) 공개일자 2012년11월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/56 (2006.01) *C12N 15/29* (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0042934
(22) 출원일자 2011년05월06일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스내 (서천동, 경희대학교)
(72) 발명자
정인식
서울특별시 강남구 남부순환로 2803, 삼성래미안아파트 109동 1102호 (도곡동)
강형식
광주광역시 북구 임방울대로1042번길 14-1, 첨단자이아파트 102동 602호 (신용동)
(뒷면에 계속)

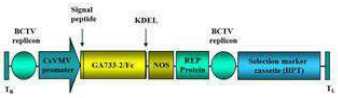
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 **식물유래 재조합 단백질 소재에 의해 숙지된 수지상세포를 이용한 대장암 면역 치료제**

(57) 요 약

본 발명은 수지상 세포를 이용한 대장암 면역 치료용 약학 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 GA733-2 형질전환 식물 발현 단백질 소재에 의해 숙지된 수지상 세포를 함유하는 대장암 면역 치료 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 약학 조성물은 항암 활성 뿐만 아니라 면역 반응 효율 증가를 통하여 대장암을 치료 할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

고기성

전라북도 익산시 동서로 509, 101동 205호 (어양동, 익산자이)

정영희

대전광역시 유성구 은구비남로 13, 1506호 (지족동, SK허브)

유기현

인천광역시 부평구 부개1동 251-2 동원아파트 905동 403호

장윤지

광주광역시 서구 화정3동 대림아파트 103동 1003호

특허청구의 범위

청구항 1

GA733-2-Fc 형질전환 식물 발현 단백질 소재에 의해 숙지된 수지상 세포를 함유하는 대장암 면역 치료용 약학 조성물

청구항 2

제1항에 있어서, pBCTVR-CsVMV- GA733-2/Fc/ER 벡터를 이용하여 GA733-2-Fc 단백질 소재를 제조하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 GA733-2-Fc 식물 발현 단백질 소재는 항암 활성 및 면역 반응 효율 증가를 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 대장암은 선암, 악성유암종, 평활근육종 및 림프종으로 구성된 군에서 선택되는 암인 것을 특징으로 한다.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 식물유래 재조합 단백질(GA733-2-Fc) 소재에 의해 숙지된 수지상세포를 이용한 대장암 면역 치료제에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 GA733-2-Fc 형질전환 식물 발현 단백질 소재에 의해 숙지된 수지상 세포를 함유하는 대장암 면역 치료 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 현재 임상학적으로 사용되는 있는 암의 3대 치료 방법은 수술, 방사선 요법 및 화학요법 등이 있는데 암의 성질에 따라 각각의 치료방법이 한계를 갖고 있어서 단독 또는 복합적으로 사용되고 있으나 아직 이러한 치료방법에 의해 암을 완치하지 못하고 환자에게 심한 부작용과 고통을 수반하고 있는 실정이다. 따라서 이러한 기존 치료법의 한계 및 부작용을 극복할 수 있는 새로운 개념의 항암 치료법 개발이 요구된다.

[0003] 최근에 면역학적 방법을 이용하여 암을 치료하려는 새로운 시도가 활발히 진행되고 있다. 이는 우리 몸의 방위를 책임지고 있는 면역 반응의 활성을 유도하여 종양 세포를 감지하고 사멸하게 하는 치료법으로 항암 백신이 여기에 포함된다. 수지상 세포를 이용한 방법이 가장 효과적인 것으로 손꼽히고 있다. 수지상 세포는 생체내의 가장 강력하고 중요한 항원제시세포인 관계로 항종양백신 뿐만 아니라 면역반응이 관여하는 대부분의 질환에서 그 응용 가치가 매우 높다. 이러한 점에서 수지상세포를 이용한 면역치료법은 가장 효과적인 항종양백신으로서의 가능성을 제시하고 있다.

[0004] 이에, 본 발명자들은 상기 문제점을 해결하기 위하여 예의 노력한 결과, GA733-2-Fc 단백질 소재는 대장암 모델에서 종양 성장 억제능을 가진다는 사실을 확인하였고, 특히 GA733-2-Fc 형질전환 식물 발현 단백질 소재에 의해 숙지된 수지상 세포를 통하여 대장암 면역 치료 및 예방 할 수 있다는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 면역 반응 조절을 통하여 대장암을 치료하는 조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 목적을 달성하기 위하여, 형질전환 식물 발현 단백질 소재에 의해 숙지된 수지상 세포를 이용한 대장암 면역 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0007] 본 발명에 있어서, 상기 대장암은 선암, 악성유암종, 평활근육종 및 림프종으로 구성된 군에서 선택되는 암인 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0008] 본 발명에 따른 GA733-2-Fc 형질전환 식물 발현 단백질 소재에 의해 숙지된 수지상 세포를 함유하는 약학 조성물은 대장암 면역 치료에 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 GA733-2-Fc 형질전환 식물 발현 단백질 소재를 발현할 수 있도록 형질전환시키는데 사용되는 pBCTVR-CsVMV- GA733-2/Fc/ER 발현 벡터의 모식도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 형질전환된 GA733-2-Fc 식물 발현 단백질 소재의 발현을 웨스턴 블럿 분석을 통해 조사한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 대장암 모델에서 GA733-2-Fc 식물 발현 단백질 소재의 종양 활성을 나타낸 그래프이다 (a: 종양 부피, b: flow cytometry).

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 재조합 GA733-2 단백질을 이용한 NK 세포 활성 효능을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] 본 발명에서는 인체에 무독성이면서 면역 부작용을 유발하지 않는 GA733-2-Fc 형질전환 식물소재에 의한 면역반응 조절 기능 탐색 및 대장암 치료 효율 향상을 확인하고자 하였다.

[0011] 본 발명에서는 GA733-2-Fc 형질전환 식물 발현 단백질 소재에 의해 숙지된 수지상 세포가 대장암에 대하여 항종양 활성을 가지고 있는지를 확인하고자 하였다.

[0012] 본 발명에서는 GA733-2-Fc 형질전환 식물 발현 단백질 소재를 제조한 후, 이를 대장암을 유발시킨 실험용 동물에 처리하였다. 그 결과, GA733-2-Fc 단백질 소재가 대장암의 성장을 저해 시킨다는 사실을 확인할 수 있었다.

[0013] 즉, 본 발명의 일 실시예에서는 재조합 GA733-2 단백질 소재로 처리된 대장암 세포의 proliferation, migration, invasion assay와 종양 성장 측정으로, 재조합 GA733-2 단백질 소재가 대장암 모델에서 항암 활성을 가지는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 NK cell activation assay 및 면역관련 항체를 이용한 flow cytometry 분석으로 면역관련 항체의 발현 변화를 확인 할 수 있었다.

[0014] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, GA733-2-Fc 형질전환 식물 발현 단백질 소재에 의해 숙지된 수지상 세포를 함유하는 대장암 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0015] 대장암은 결장과 직장에 생기는 악성 종양을 의미하며, 대장암의 대부분은 대장의 점막에서 발생하는 선암이다. 본 발명에 있어서, 상기 대장암은 선암, 악성유암종, 평활근육종 및 림프종으로 구성된 군에서 선

택되는 암인것을 특징으로 한다.

[0016] 본 발명에 따른 상기 대장암 면역 치료용 약학 조성물은 상기 유효성분을 단독으로 포함할 수 있으며, 이외 제형, 사용방법 및 사용목적에 따라 약제학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다. 혼합물로 제공되는 경우, 상기 유효성분은 대장암 치료용 약학 조성물에 0.001 내지 99.9 중량%로 포함될 수 있으나, 통상 0.1 내지 50 중량%의 함량으로 포함되는 것이 바람직하다.

[0017] 상기 GA733-2-Fc 단백질 소재에 의해 숙지된 수지상 세포를 이용한 대장암 면역 치료용 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 제형 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0018] 또한, 상기 GA733-2-Fc 단백질 소재에 의해 숙지된 수지상 세포를 이용한 대장암 면역 치료용 약학조성물의 인체에 대한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

부호의 설명

[0019] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실시예 1: GA733-2-Fc 식물 발현 단백질 소재 유전자의 클로닝 및 발현 벡터의 제조

GA733-2를 PCR 방법으로 증폭하고 이 유전자를 T-vector에 클로닝 한 후, 이 유전자 산물에 c-Myc tag과 histidine tag을 첨가하기 위하여 Impact 벡터에 Nco I과 Not I을 이용하여 클로닝하였다. 그리고 클로닝 후 BCTV replicon 벡터로 도입하기 위해 다시 PCR 방법으로 증폭하고 T-vector에 클로닝 하였다. 이 유전자를 Nco I과 Spe I을 이용하여 서브클로닝 하여 pBCTVR-CsVMV-GA733-2 벡터를 구축하였다. Human IgG의 Fc domain을 GA733-2 유전자에 융합하였다. ER retention signal을 포함하고 있는 GA733-2 유전자에 human Fc domain을 fusion 시킨 후 BCTV 발현 시스템에 도입하여 pBCTVR-CsVMV-GA733-2 /Fc/ER 벡터를 구축하였다 (도 1).

실시예 2: GA733-2-Fc 식물 발현 단백질 확인

GA733-2-Fc 유전자가 클로닝된 BCTV replicon 함유 벡터 시스템을 *Agrobacterium*을 이용하여 담배 잎에 infiltration 실험을 수행하였다. 각 잎 시료로부터 추출한 단백질을 SDS-PAGE와 Western blot 분석 및 Protein A column을 이용하여 단백질 분리 정제 하였다 (도 2).

실시예 3: GA733-2-Fc 식물 발현 단백질 소재의 항암 활성 효능 평가

3-1: GA733-2-Fc 식물 발현 단백질 소재의 면역

경희대학교 동물관리 사육위원회의 실험동물 사육 및 이용에 대한 지침을 준수하여, 실험에 사용된 5주령의 암컷 BALB/c mouse(Orient BIO, Gyeonggi-do, Korea)는 자유롭게 물 및 사료를 섭취하도록 하였고, 특정 병원체가 존재하지 않는 공간에 격리시켜 12시간 간격으로 빛을 조사하며 사육하였다.

GA733-2-Fc 형질전환 식물 발현 단백질 소재 항원을 정제하여 실험동물에 adjuvant를 이용하여 복강주사로 면역을 하였다. 실험동물을 (1) saline, (2) control, (3) GA733-2-Fc 군으로 나누어 실험하며 치료군당 14마리씩, 최소 3회의 동일 실험을 반복하였다.

3-2: GA733-2-Fc 식물 발현 단백질 소재 면역에 의한 생체내 종양 실험

상기 GA733-2-Fc 식물 발현 단백질 소재 마지막 면역 후 2주 뒤 이소 대장암종(heterotopic colon carcinoma) 동물 모델을 구축하기 위하여, 100 l의 5 10^5 CT-26 세포를 BALB/c 쥐의 우측 서혜부(right flank)에 피하 주사하였다. 육안으로 확인할 수 있는 크기로 종양을 6일간 성장시켰다. 종양 접종 17일, 18일 후, 모든 쥐를 희생시켜 종양을 절제하고 무게를 측정하였다. 종양의 길이와 넓이는 캘리퍼(caliper)로 측정하였고, 종양의 양은 표준공식[length width squared 0.5] (Cancer Res 47:4243~4247, 1987)에 의하여 측정하였다. 본 실시예의 측정값은 mean S.E로 나타내었고, Student *t* test를 이용하여 유의성(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)을 검증하였다.

대장암종 면역원성 모델에서 GA733-2-Fc 식물 발현 단백질 소재의 항종양 활성을 측정한 결과, 대조군에서는 CT-26 세포 주입 18일후에 종양은 급격하게 성장하여 평균 부피 1006.1 243.3 mm^3 (mean S.E.)를 나타내었으며, GA733-2-Fc 식물 발현 단백질 소재가 면역된 쥐에서의 원발성 종양(789.0 221.6 mm^3)은 22% 감소되었음을 알 수 있었다 (도 3a).

3-3: GA733-2-Fc 식물 발현 단백질 소재 면역에 의한 생체내 면역 반응 변화

상기 대장암종 면역원성 모델에서 12일째 실험동물을 무작위로 2마리 선별하여 tumor infiltration lymphocyte를 분리하여 수지상 세포의 특이적 표식자인 Gr-1/Mac-1 항체 조합으로 이중 염색 후 flow cytometry를 수행하였다. 수지상 세포 표식자로 알려진 Gr-1에 의해 염색된 세포가 대조군에 비해 GA733-2-Fc 식물 발현 단백질 소재 면역 군에서 3.3배 증가하였다 (도 3b).

실시예 4: 재조합 GA733-2 단백질을 이용한 NK 세포 활성 효능 검증

사람 대장암 세포(HCT-116)에 재조합 GA733-2 단백질을 처리하고, 24시간 동안 사람 NK 세포를 재조합 IL-2, IL-12, IL-15로 자극하였다. 표적 세포인 HCT-116 세포를 100uci의 ^{51}Cr으로 2시간동안 표지 한 후 활성화된 NK 세포와 1:0.25, 1:1, 1:4, 1:16등의 비율로 섞어 반응시키고 4시간 후 세포배양액으로 배출된 ^{51}Cr의 양을 측정하였다. 대조군에 비해 HCT-116 세포에 재조합 GA733-2 단백질을 처리한 군에서 NK세포에 의해 분해되어 방출된 ^{51}Cr양이 증가되는 것을 확인 할 수 있었다 (도 4).

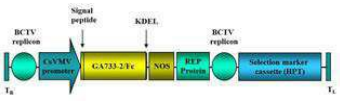
실시예 5: 골수세포에서 수지상 세포의 분리

8-12 주령 된 실험동물 (C57BL/6)로부터 전체 골수세포를 얻은 후 고장액으로 적혈구를 제거하고 골수세포를 분리하였다. 분리한 골수세포에 hybridoma 배양액 (JiJ.10 (anti-CD90), GK 1.5 (anti-CD4), RA3-3A1 (anti-B220), M5/114.15.2 (anti-Ab, d, q & I-Ed, K)와 도체 (complement)를 반응시켜 각각의 세포를 제거하였다. Histopaque1077 (Sigma)를 이용한 밀도 차에 의한 단핵구 세포를 분리하였다. 24 well plate에 well당 5^5 세포를 분주하고 GM-CSF 10 ng/ml, IL-4 10 ng/ml이 첨가된 RPMI-1640 10% FBS 배지에 배양하였다. 2일과 4일째, 바닥에 붙지 않은 세포와 배양액을 제거하고 새로운 배양액으로 교체하였다. 7일째, 수지상의 바닥에 붙지 않은 미숙한 (immature) 수지상 세포를 이용하여 실험에 사용하였다.

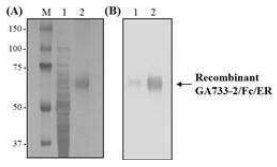
이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시형태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

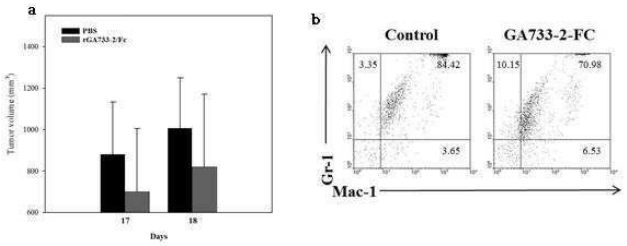
도면1



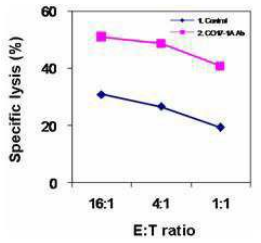
도면2



도면3


a
PBS
rGA733-2/Fc
Tumor volume (mm³)
1400
1200
1000
800
600
17
18
Days
b
Control
GA733-2-FC
3.35
84.42
3.65
10.15
70.98
6.53
Gr-1
Mac-1

도면4


60
40
20
0
Specific lysis (%)
16:1
4:1
1:1
E:T ratio