



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0089050
(43) 공개일자 2012년08월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 39/39 (2006.01) A61K 38/10 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0010165

(22) 출원일자 2011년02월01일

심사청구일자 2011년02월01일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

신성재

대전광역시 중구 문화로 266, 충남대학교 의학전문대학원 미생물학교실 (문화동)

정인덕

경상남도 양산시 양주로 39, 주공아파트 8단지 805동 1902호 (남부동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김순용

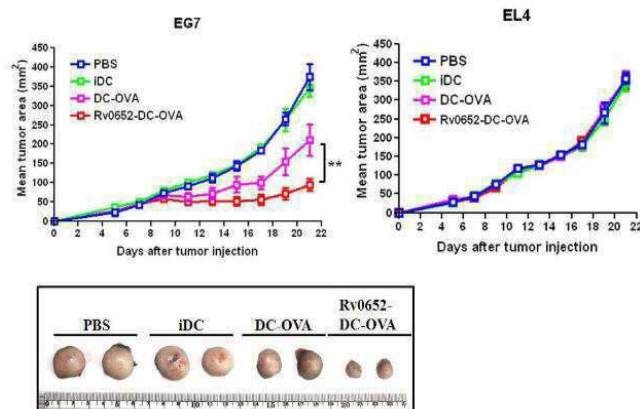
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 결핵균의 Rv0652 단백질을 아쥬반트로 이용한 수지상 세포 암 치료제

(57) 요약

본 발명은 수지상 세포 암 치료제에 관한 것이다. 더욱 구체적으로는 결핵균의 Rv0652를 아쥬반트로 이용한 수지상 세포 암 치료제에 관한 것이다. 본 발명의 결핵균의 Rv0652를 아쥬반트로 이용한 수지상 세포 암 치료제는 종양의 성장을 효과적으로 억제시킨다.

대표도 - 도6



(72) 발명자

박영민

서울특별시 은평구 통일로 780, 3동 702호 (불광동, 미성아파트)

김화중

대전광역시 중구 문화로 266, 충남대학교 의학전문대학원 미생물학교실 (문화동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010-0008728

부처명 교육과학기술부

연구사업명 기초연구사업-중견연구자지원사업-핵심연구지원사업

연구과제명 항산균의 병원성인자에 의한 면역세포의 분화조절 기전 연구

주관기관 충남대학교 산학협력단

연구기간 2010.05.01 ~ 2011.04.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A091047-0911-0000300

부처명 보건복지부

연구사업명 병원특성화센터 지원사업

연구과제명 수지상세포 기반 항암면역요법 개발

주관기관 양산부산대학병원

연구기간 2010.04.01 ~ 2011.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

미성숙 수지상 세포에 결핵균의 Rv0652를 아쥬반트로 첨가하여 제조된 수지상 세포 암 치료제.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 Rv0652는 *E. coli*에 발현시킨 재조합 Rv0652(rEC-Rv0652)인 것을 특징으로 하는 수지상 세포 암 치료제.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 재조합 Rv0652는 서열번호: 1의 정방향 프라이머 및 서열번호 : 2의 역방향 프라이머로 PCR 증폭시킨 후 발현시켜 생산된 것을 특징으로 하는 수지상 세포 암 치료제.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 Rv0652를 넣고 20 내지 30시간 배양하여 제조되는 것을 특징으로 하는 수지상 세포 암 치료제.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 Rv0652는 수지상 세포의 배지에 0.1 내지 2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 용량으로 첨가되는 것을 특징으로 하는 수지상 세포 암 치료제.

청구항 6

제 3항에 있어서, 상기 수지상 세포에 Rv0652를 넣고 배양한 후에 추가로 중양 단백질을 넣고 배양하여 제조된 것을 특징으로 하는 수지상 세포 암 치료제.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 수지상 세포 암 치료제에 관한 것이다. 더욱 구체적으로는 결핵균의 Rv0652 단백질을 아쥬반트로 이용한 수지상 세포 암 치료제에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 수지상 세포 또는 수상돌기 세포(dendritic cell, DC)는 포유동물의 면역계의 일부를 이루는 면역 세포이다. 이 세포들은 항원 물질을 처리하여 그것을 표면에 나타나게 함으로써 면역계의 다른 세포가 인식하게 하는 항원 발현 세포의 역할을 한다. 수지상 세포는 주로 피부(피부에 있는 세포를 특히 랑게르한스 세포라 부름), 코, 폐, 위 및 장의 내벽과 같이 외부 환경과 접하는 조직에 소량 존재한다. 그것들은 또한 혈액 중에서 미성숙한 상태로 발견될 수 있다. 일단 활성화되면 림프기관으로 이동하여 T 세포 및 B 세포와 상호작용하여 면역반응이 시작되게 한다. 특정 발달 단계에서 그것들은 수상돌기(dendrites)라고 하는 돌기를 뻗는다.

[0003] 수지상 세포는 조혈 골수 전구세포(hemopoietic bone marrow progenitor cells)로부터 유래한다. 이

전구세포는 처음에는 미성숙 수지상 세포로 변화한다. 이 세포들은 높은 엔도시토시스 활성 및 T-세포 활성 능력을 특징으로 한다. 미성숙 수지상 세포는 주변에 있는 바이러스와 박테리아와 같은 병원체를 끊임없이 탐식한다. 이것은 TLR(toll-like receptor)와 같은 패턴 인식 수용체(pattern recognition receptor, PRR)를 통해서 가능하다. TLR은 병원체의 서브셋 상에서 발견되는 특정 화학적 특징을 인식한다. 미성숙 수지상 세포는 또한 살아있는 자가 세포로부터 니블링(nibbling)이라는 과정을 통해 약간의 세포막을 탐식한다. 일단 그것들이 현존하는 항원과 접하게 되면, 그것은 성숙 수지상 세포로 활성화되어 림프절로 이동한다. 미성숙 수지상 세포는 병원체를 탐식하고 자신의 단백질을 작은 조각들로 분해해서, 성숙하였을 때 이 조각들이 MHC 분자를 이용하여 그 세포 표면에 나타나게 된다. 동시에, 그것은 CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), 및 CD40과 같이 T-세포 활성화에서의 공동-수용체로 작용하는 세포 표면 수용체를 증가시킨다. 그것들은 또한 수지상 세포가 혈류를 통해 비장으로 가거나 림프계를 통해 림프절로 이동하게 유도하는 주화성 수용체인 CCR7를 증가시킨다. 여기서 이 세포들은 항원 발현 세포로 작용한다: 그것들은 비항원성 특정 공동자극 신호와 함께 병원체에서 유래한 항원을 나타냄으로써 헬퍼 T-세포, 킬러 T-세포 뿐만 아니라, B 세포를 활성화시킨다.

[0004] 모든 헬퍼 T-세포는 하나의 특정 항원에 대해 특이적이다. 오직 전문적인 항원 발현 세포(대식세포, B 림프구 및 수지상세포)만이 맞는 항원이 존재할 때 나머지 헬퍼 T-세포를 활성화시킨다. 그러나 대식세포와 B 림프구는 메모리 T-세포만 활성화시킬 수 있는 반면에 수지상 세포는 메모리 및 처녀(naive) T-세포를 모두 활성화시킬 수 있어서 가장 강력한 항원 발현 세포이다.

[0005] 성숙 수지상 세포는 신체를 순환하는 백혈구인 단핵구로부터 유래할 수 있는데, 단핵구는 적절한 신호에 따라 수지상 세포로도 대식세포로도 바뀔 수 있다. 단핵구는 골수의 줄기세포에서 유래한다. 단핵구-유래 수지상 세포는 실험실에서 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)로부터 생성될 수 있다. PBMC를 조직 배양 플라스크에 심어서 단핵구가 부착되게 할 수 있는데 이 단핵구를 IL-4 및 GM-CSF(granulocyte-macrophage colony stimulating factor)로 처리함으로써 미성숙 수지상 세포로 분화시킬 수 있다. 이후에 TNF- α 로 처리하면 미성숙 수지상 세포가 성숙 수지상 세포로 분화된다.

[0006] 수지상 세포는 혼치 않고 분리하기 어렵기 때문에 서로 다른 유형과 서브셋의 수지상 세포의 정확한 생성과 발달 및 그 상호관계에 대해서는 오직 대략적으로만 알려졌다. 수지상 세포는 신체의 다른 세포들과 끊임 없는 소통을 한다. 이러한 소통은 세포 표면 단백질의 상호작용에 근거한 직접적인 세포 대 세포 접촉의 형태를 취할 수 있다. 예를 들면, 수지상 세포의 수용체 B7과 림프구의 CD28과의 상호작용을 들 수 있다.

[0007] 그러나 세포 간 상호작용은 사이토카인을 통해서 떨어진 상태로도 일어날 수 있다. 생체 실험에서 미생물 추출물에 의해 수지상 세포를 자극함으로써 수지상 세포가 빠르게 IL-12를 생산하게 했다. IL-12는 처녀 CD4 T 세포가 Th1 표현형이 되게 한다. 최적의 결과는 수지상 세포가 표면에 나타낸 항원에 대해 공격하도록 면역계를 활성화시키는 것이다.

[0008] 수지상 세포에 의해 생산되는 사이토카인은 세포의 유형에 따라 다르다. 림프구성 수지상 세포는 다량의 타입-1 IFN을 생산할 수 있는데 그것은 더 많은 활성화된 대식 세포를 모아서 탐식작용을 가능하게 한다. 림프구성 수지상세포는 중추와 말초 면역조절에 관여하고, 골수성 수지상 세포는 외래성 항원이나 감염에 대한 면역유도에 관여하는 것으로 알려져 있다. 따라서 수지상 세포가 정상 기능을 못할 경우 당뇨병, 류머티스성 관절염, 알러지성 과민반응과 같은 자가 면역 질환이 나타나거나 감염성 질환이나 암 발생에 대해 정상적인 면역반응이 일어나지 않게 된다.

[0009] 암환자에서는 수지상 세포의 기능이 저하되어 있어 정상적 항암 면역능을 유도하는 것이 어렵다. 지금까지 수지상 세포의 분화를 조절(활성화)하는 물질들(LPS, TNF- α , IL-1 β)은 많이 알려져 있으나 생체독성의 부작용으로 생체내의 직접적인 응용에 문제가 많다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 상기와 같이 수지상 세포는 신체 자체의 면역 기능을 높이는데 중요한 역할을 하고 있어, 강력한 면역 반응을 일으키는 수지상 세포의 분화를 촉진하는 무독성의 면역조절제의 개발과 그 물질의 작용기전을 명확히 이해하는 것은 수지상 세포를 이용한 세포 면역 치료, 특히 암 치료분야에서 중요한 과제가 되고 있다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명자들은 상기와 같은 요구를 충족시키기 위하여 연구를 거듭한 결과 결핵균에서 유래한 Rv0652 단백질이 수지상 세포를 효과적으로 성숙시킨다는 사실을 발견하고 이를 아쥘반트로 이용한 수지상 세포 암 치료제를 개발하였다.
- [0012] HBHA(heparin-binding hemagglutinin)는 결핵균 항원의 메인 28-kDa의 단백질로 표적 세포의 표면에서 HS(heparan sulfate) 함유 프로테오글리칸과 상호작용하는 C-말단 리신 풍부 도메인을 통해서 상피세포에 부착한다. HBHA는 최근에 표면에 노출되고 및 표면으로 분비되는 항원으로 밝혀졌는데, 잠복성 결핵을 가진 건강한 개체에서는 혈중 CD4+ 및 CD8+ T 림프구에 의한 강력한 IFN- γ 의 생산을 유도하지만 활성 결핵 환자에서는 그렇지 않다고 알려졌다. 본 발명자들은 이러한 HBHA를 수지상 세포의 성숙에 이용할 수 있을 것이라고 생각하고 연구한 결과 HBHA를 가지고 수지상 세포를 효과적으로 성숙시킬 수 있고 그를 통해 암치료가 가능하다는 사실을 발견하게 된 것이다.
- [0013] Rv0652 단백질은 결핵균의 50S 리보솜 단백질 L7/L12이다. L7과 L12을 코딩하는 유전자는 Rv0652(rpIL)로서 L7의 아미노 말단부위가 아세틸화된 것을 제외하고는 동일한 단백질이다. 특히 이 단백질은 우리나라에서 흔히 분리되는 임상균주인 K-균주의 배양액에 표준균주에 비해 비교적 풍부히 존재하는 단백질이다. Rv0652 단백질의 계산된 분자량은 13.4-kDa이지만 실제 천연 분리 단백질은 15-kDa이며 대장균에서 발현된 단백질은 22-kDa 정도였다. 이는 재조합 단백질로 발현되는 경우 폴리-His이 부착되어 분자량이 증가된 것으로 생각된다.
- [0014] 따라서 본 발명은 미성숙 수지상 세포에 결핵균에서 유래한 Rv0652를 아쥘반트로 첨가하여 제조된 수지상 세포 암 치료제를 제공한다.
- [0015] 상기 미성숙 수지상 세포는 종래 알려진 방법으로 채취하여 분화시킬 수 있다. 즉, 골수 세포 또는 단핵구에 GM-CSF 및 IL-4를 넣고 6일간 배양하여 미성숙 수지상 세포로 분화시킬 수 있다.
- [0016] 바람직하게는 상기 Rv0652는 *E. coli*에 발현시킨 재조합 Rv0652(rEC-Rv0652)이다. 더욱 바람직하게는 상기 재조합 Rv0652는 서열 5'-GGATCCATGGCAAAGCTC-3'(서열번호: 1)의 정방향 프라이머 및 서열 5'-GAATTCCTTGACGGT-3'(서열번호: 2)의 역방향 프라이머로 PCR 증폭시킨 후 발현시킨 것이다.
- [0017] 바람직하게는 본 발명의 수지상 세포 암 치료제는 상기 Rv0652를 넣고 20 내지 30시간 배양하여 제조된다.
- [0018] 또한 바람직하게는 상기 Rv0652는 수지상 세포의 배지에 0.1 내지 2.0 $\mu\text{g/ml}$ 의 용량으로 첨가된다.
- [0019] 본 발명의 수지상 세포 암 치료제는 치료 효과를 높이기 위해서 Rv0652를 넣고 배양한 후에 추가로 종양 단백질을 넣고 배양하여 제조할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 종양 단백질 대신 OVA(ovalbumin)를 이용하여 수지상 세포의 항암 효과가 더욱 증진됨을 입증하였다(실시예 7 및 8).
- [0020] 상기 종양 단백질은 종양 세포에서 특이적으로 발현 및/또는 분비되는 물질을 의미하는 것으로, 예를 들면, 시냅토타그민의 C2(synaptotagmin의 C2), 아넥신 V(annexin V), VEGF(Vascular Endothelial Growth Factor), 안지오포이에틴(angiopoietin), 소마토스타틴(somatostatin), 바소인테스티날 펩타이드(vasointestinal peptide), 암성 태아성 항원(carcinoembryonic antigen), HER2/neu 항원(HER2/neu antigen), 전립선 특이 항원(prostate-specific membrane antigen) 등이 언급될 수 있다.
- [0021] 본 발명의 수지상 세포 암 치료제는 비경구적으로 예를 들어, 피하, 복강, 근육 내, 경피(transdermal/transcutaneous) 주사로 투여될 수 있으나 이에 한정되지는 않는다. 본 발명의 암 치료제는 또한 직접 종양의 병변 부위에 투여될 수도 있다. 본 발명의 수지상 세포 암 치료제는 단일 투여 또는 다중 투여 스케줄에 따라 투여될 수 있으며, 기타 면역조절제와 함께 투여될 수도 있다.
- [0022] 본 발명의 암 치료제는 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제와 함께 본 발명의 수지상세포를 포함하는데, 이러한 담체는 그 자체로 치료제를 투여 받는 개체에 유해한 반응을 일으키지 않는 임의의 담체인 것이 바람직하다. 적합한 담체는 통상적으로 크고 느리게 대사화되는 거대분자, 예를 들어 단백질, 다당류, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 중합체 아미노산, 아미노산 공중합체, 지질 응집체(예를 들어, 오일 소적 또는 리포솜) 및 불활성 바이러스 입자를 포함하나 이에 한정되지는 않는다. 이러한 담체는 당업자에

게 잘 알려져 있으며, 수지상세포 자체의 면역보강제 효과 이외에 면역자극제 또는 면역보강제로서 작용할 수 있다.

[0023] 본 발명의 암 치료제는 또한 치료제의 유효성을 증강시키는 추가의 면역보강제를 포함할 수 있다. 예를 들면, 수산화알루미늄, 인산알루미늄, 황산알루미늄 등과 같은 알루미늄염(명반); 마이크론 이하의 입자로 제제화된 5% 스쿠알렌, 0.5% 트윈 80 및 0.5% 스펠 85(선택적으로 다양한 양의 N-아세틸뮤라밀-L-알라닌-D-이소글루타미닐-L-알라닌-2-(1',2'-디팔미토일-sn-글리세로-3-히드록시포스포틸옥시)-에틸아민(MTP-PE)을 함유함)를 포함하는 MF59 (WO90/14837), 마이크론 이하의 입자로 마이크론 유체화되거나 큰 입자 크기의 에멀전을 생성하도록 진탕된 10% 스쿠알렌, 0.4% 트윈 80, 5% 플루로닉-블록화 중합체 및 N-아세틸-뮤라밀-L-트레오닐-D-이소글루타민(thr-MDP)을 포함하는 SAF, 및 모노포스포릴리피드 A(MPL), 트레할로오스 디마이콜레이트(TDM) 및 세포벽 골격(CWS)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 세균 세포벽 성분, 2% 스쿠알렌 및 0.2% 트윈 80을 포함하는 RibiTM 면역보강제 시스템(RAS) 등과 같은 수중유 에멀전 제제; 사포닌 면역보강제; 프로인트의 완전 면역보강제(complete Freund's adjuvant, CFA) 및 불완전 면역보강제(IFA); IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 등의 인터루킨, 감마 인터페론 등의 인터페론, 대식세포 콜로니 자극 인자(M-CSF) 및 종양 괴사 인자 (TNF) 등의 사이토카인; 콜레라 독소(CT), 백일해 독소(PT), 또는 대장균(*E. coli*)의 열에 불안정한 독소(LT), 특히 LT-R72, CT-S109, PT-K9/G129의 탈독소화된 돌연변이체(W093/13302 및 W092/19265) 등과 같은 세균의 ADP-리보실화 독소; 및 암 치료제의 유효성을 증강시키는 면역자극제로서 작용하는 기타 물질을 포함하지만 이에 한정되는 것은 아니다.

[0024] 본 발명의 수지상 세포 암 치료제는 희석제, 예를 들어 물, 생리식염수, 글리세롤, 에탄올 등을 추가로 포함할 수 있으며, 그 외에 보조 물질, 예를 들어 습윤제, 유화제, pH 완충제 등을 더 포함할 수 있다.

[0025] 본 발명의 암 치료제의 주사용으로 적합한 형태는 멸균 주사용액, 또는 주사제 즉석 제조용 멸균 수성 용액 또는 분산액 및 멸균분말을 포함한다. 이들은 제조 조건 하에서 안정해야 하고, 세균 또는 진균과 같은 미생물의 오염에 대하여 보존되어야 한다. 미생물의 오염은 다양한 항세균제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산, 치메로살 등을 사용하여 예방할 수 있다. 암 치료제의 안정성 및 효능을 해치지 않는다면 환자의 고통을 줄이기 위해서 당 또는 염화나트륨 등과 같은 등장화제를 포함하는 것이 바람직하다.

[0026] 본 발명의 암 치료제를 장시간 흡수되게 하기 위해서 알루미늄 모노스테아레이트 또는 젤라틴과 같이 흡수를 지연시키는 첨가물을 첨가할 수 있다.

[0027] 진술한 용매 중에 Rv0652를 아조반트로 사용하여 전처리한 유효량의 수지상세포와 앞에서 열거한 다양한 기타 성분을 결합시키고, 필요에 따라 수지상세포 및/또는 열에 민감한 면역보강제 사이토카인 등을 제외한 나머지 성분들, 예를 들면 PBS와 같은 완충용액을 여과 멸균함으로써 멸균 주사용액을 제조한다. 통상 기본적인 분산매질 및 필요한 기타 성분을 함유하는 멸균 용기 내로 다양한 멸균화 활성성분을 포함시킴으로써 분산액을 제조한다.

[0028] 상기 '유효량'은 목적하는 면역반응을 적어도 부분적으로 달성하거나 또는 치료되어야 할 특정 질환의 발병 또는 진행을 지연하거나 전적으로 중지시키는 데 필요한 양을 의미한다. 이 양은 치료되어야 할 개체의 건강과 물리적 상태, 치료되어야 할 개체의 분류적 군, 항체를 합성하는 개체의 면역계의 능력, 목적하는 보호의 정도, 의학적 상황의 평가 및 기타 관련 인자에 따라 달라진다. 이 양은 통상적인 시도를 통해 측정될 수 있는 비교적 광범위한 범위에 속할 것으로 예상된다.

[0029] 본 발명자들은 우선 수지상 세포를 성숙시키는 Rv0652의 효능 실험을 하기 전에 Rv0652의 수지상 세포에 대한 독성 실험을 하였다. 도 1b에 나타난 바와 같이 수지상 세포에 Rv0652를 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 까지 처리하여 아넥신-V로 염색하였는데 그 결과 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 까지는 수지상 세포에 세포독성이 나타나지 않았으므로 약 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 정도의 Rv0652는 수지상 세포에 독성이 없다고 할 수 있다.

[0030] 본 발명의 일 실시예에서는 Rv0652가 미성숙 수지상 세포를 성숙시키는지에 대한 실험을 했다. 수지상 세포가 성숙하면 보조자극인자와 MHC class I, II와 같은 분자의 발현이 현저히 증가하므로 수지상 세포에 Rv0652를 각각 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 후 24시간 동안 37°C에서 배양했다. 여기서 LPS를 양성 대조군으로 사용하여 Rv0652의 효과를 비교하였다. 도 2a에서 볼 수 있는 바와 같이 Rv0652는 수지상 세포의 표면 분자를 용량 의존적으로 증가시켰다. 그러므로 Rv0652는 수지상 세포의 표면 분자 변화에 영향을 끼칠 수 있다.

[0031] 본 발명의 다른 실시예에서는 Rv0652가 수지상 세포를 성숙시킨다는 것을 더욱 확실하게 확인하기 위해서 수지상 세포가 항원을 포식하는 능력을 측정하였다. 수지상 세포는 미성숙한 상태에서는 포식 작용이 활발하지만 항원을 포식하여 성숙하게 되면 더 이상 탐식작용이 일어나지 않는다. 그러므로 성숙하게 된 수지상 세포일수록 항원 탐식 능력이 떨어지게 된다. 항원 탐식능력은 FITC로 염색된 텍스트란을 이용하여 실험하였다. 6일 동안 배양시킨 수지상 세포를 두 그룹으로 나누어서 하나는 Rv0652를 24시간 처리하고 하나는 처리하지 않았다. 상기 두 그룹의 수지상 세포에 FITC로 염색한 텍스트란을 처리한 뒤 다시 수지상 세포를 CD11c-PE로 염색하여 유세포분석기로 분석하였다. 도 2d에 나타난 바와 같이, Rv0652를 처리한 수지상 세포가 그렇지 않은 것보다 항원 포식 능력이 감소하였다. 이러한 점에서 Rv0652가 기능적인 면에서 수지상 세포를 성숙시킴을 알 수 있다.

[0032] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 Rv0652가 수지상 세포의 사이토카인 분비에 미치는 영향을 알아보기 위해 실험을 했다. 수지상 세포가 성숙하게 되면 분비하는 사이토카인 역시 변하게 된다. 그러므로 수지상 세포를 Rv0652로 처리했을 때 T-세포에 영향을 주는 전염증 또는 항염증성 사이토카인 분비의 변화에 영향을 주는지를 실험하였다. IL-12와 IL-10은 수지상 세포에서 분비되는 주요 사이토카인으로 각각 T 세포가 Th1과 Th2로 분화되는데 중요한 역할을 한다. 수지상 세포에서 분비되는 TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-12p, IL-10을 ELISA로 측정하였다. 도 2c에 나타난 바와 같이 IL-12가 증가했고 전염증 사이토카인인 TNF- α , IL-6, IL-1 β 또한 증가하였으므로, Rv0652가 수지상 세포를 성숙하게 하여 사이토카인의 양에 변화를 준다는 것을 알 수 있다.

[0033] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 Rv0652를 처리한 수지상 세포에서 CCL7의 발현이 어떻게 달라지는지 실험하였다. 수지상 세포가 성숙하게 되면 이동 능력이 증가하게 되므로 이동과 관련된 수용체를 수지상 세포가 성숙하였는지를 나타내는 지표로 이용할 수 있다. 수지상 세포의 이동 관련 수용체 중 CCL19와 반응하는 CCR7이 성숙 시에 증가하기 때문에 수지상 세포에 Rv0652를 처리한 것과 양성대조군으로 LPS를 처리한 것, 그리고 아무 처리도 하지 않은 음성 대조군을 CCR7-PE 및 CD11c-FITC로 염색하여 유세포측정기로 측정하였다. 도 4a에서 알 수 있는 바와 같이, Rv0652를 처리하였을 때 처리하지 않은 수지상 세포보다 CCR7의 수치가 증가하였으므로 Rv0652가 수지상 세포의 이동 능력을 증가시킨다고 할 수 있다.

[0034] 이를 더욱 확실하게 확인하기 위하여 본 발명의 다른 실시예에서는 Rv0652로 처리한 수지상 세포의 CCL19에 대한 주화성을 실험하였다. CCR7의 결합 리간드는 CCL19라는 점을 이용해 300ng/ml의 CCL19에 반응해서 이동하는 수지상 세포의 수를 측정한 결과 Rv0652로 처리한 수지상 세포가 음성 대조군에 비해서 더 많이 이동하였음을 알 수 있었다(도 4b). 결론적으로 Rv0652는 수지상 세포를 성숙하게 만들어서 2차 림프기관으로 이동한 뒤 T 세포와 반응하는데 필요한 이동능력을 증가시킨다고 할 수 있다.

[0035] 동종 T 세포 증식을 촉진하는 능력은 in vitro에서 수지상 세포의 성질이다. 본 발명의 다른 실시예에서는 Rv0652가 수지상 세포를 활성화시킴으로써 CD8⁺ T 세포의 활성화에 관여하는지를 알아보기 위해 혼합-림프구 반응 실험을 수행하였다. 도 5에 나타난 바와 같이 수지상 세포에 의해 자극되어진 T 세포는 수지상 세포와 클러스터를 형성하게 되는데 DC/T 세포 클러스터 크기는 미처리된 세포에 의해 형성된 클러스터와 비교해서 Rv0652에 노출된 반응에서 더 증가되었다. 또한, T 세포의 증식에 대한 효과는 Rv0652를 처리한 수지상 세포와 배양한 동종 CD8⁺ T 세포의 증식률이 미처리 수지상 세포와 배양한 T 세포보다 빨랐다. 또한, Rv0652에 의해 성숙된 수지상 세포는 CD8⁺ T 세포로부터 IFN- γ 생성을 증가시켰다.

[0036] 본 발명의 Rv0652를 아쥬반트로 사용한 수지상 세포가 암세포 억제에 효과가 있는지 확인하기 위하여 본 발명의 일 실시예에서는 EG7 세포에 의해 형성된 마우스 종양모델로 실질적인 항종양 치료효과를 실험하였다. 도 6에서 알 수 있는 바와 같이, Rv0652와 OVA를 처리한 수지상 세포를 투여 받은 그룹에서 다른 그룹에서보다 종양의 크기가 훨씬 작은 것을 확인할 수 있다. 또한, 수지상 세포를 투여한 후 시간이 지날수록, 본 발명의 수지상 세포 치료제를 투여한 경우에 종양 크기의 성장이 가장 두드러지게 둔화됨을 확인할 수 있다.

[0037] 본 발명의 Rv0652를 아쥬반트로 사용한 수지상 세포가 어떻게 항종양 효능을 발휘하는지 확인하기 위해, Rv0652로 처리된 수지상 세포가 CTL 활성화, IFN- γ 및 IL-2의 생산, 활성화형 T 세포의 종양 세포로의 침윤에 미치는 영향을 분석하였다. Rv0652와 OVA를 처리한 수지상 세포를 투여 받은 그룹에서 다른 그룹에서보다 종양 세포가 효과적으로 용균되고(도 7a), IFN- γ 와 IL-2의 생산량도 증가하였다(도 7b). 또한, Rv0652와 OVA를 처리한 수지상 세포를 투여 받은 그룹에서 다른 그룹에서보다 종양 조직에 활성화형 T 세포인 CD8⁺CD69⁺ T 세포의 침윤을 증가시킴을 알 수 있었다(도 7c). 이로써, 본 발명의 Rv0652를 아쥬반트로 사용한 수지상 세포는 CTL 활성화, 사이토카인 IFN- γ 와 IL-2의 분비 촉진 및 활성화형 T 세포의 종양으로의 침윤 증가를 통해 항종

양 효과를 발휘함을 확인할 수 있다.

발명의 효과

[0038] 본 발명에 의해 종양의 성장을 효과적으로 억제시키는 결핵균의 Rv0652를 아주반트로 이용한 수지상 세포 암 치료제가 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0039] 도 1a는 재조합 Rv0652를 나타낸 것이다(좌측:SDS-PAGE, 우측:웨스턴 블롯 분석).
 도 1b는 Rv0652를 처리한 수지상 세포의 생존율 측정 실험 결과를 나타낸 그래프이다.
 도 2a는 Rv0652를 처리한 수지상 세포의 보조자극인자와 MHC class I, II의 발현 분석 실험의 결과를 나타낸 그래프이다.
 도 2b는 Rv0652를 처리한 수지상 세포의 사이토카인(IL-12p70, IL-10) 발현 실험 결과를 나타낸 그래프이다.
 도 2c는 Rv0652를 처리한 수지상 세포의 사이토카인(TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-10) 분비 실험 결과를 나타낸 그래프이다.
 도 2d는 Rv0652를 처리한 수지상 세포의 텍스트란-FITC 탐식능 측정 결과를 나타낸 그래프이다.
 도 3a 내지 3d는 Rv0652를 처리한 수지상 세포의 성숙 관여 TLR 실험 결과를 나타낸 것이다.
 도 4a는 Rv0652를 처리한 수지상 세포의 CCR7 발현 정도 실험 결과를 나타낸 그래프이다[isotype: CCR77 항체에 대한 clone control (Rat IgG2a)].
 도 4b는 Rv0652를 처리한 수지상 세포의 주화성 분석 실험에 대한 in vitro의 결과를 나타낸 그래프이다.
 도 4c는 Rv0652를 처리한 수지상 세포의 주화성 분석 실험에 대한 in vivo의 결과를 나타낸 그래프이다.
 도 5a는 Rv0652를 처리한 수지상 세포의 T 세포와의 클러스터링 형성능을 나타낸 것이다.
 도 5b는 Rv0652를 처리한 수지상 세포의 CD8+ 세포 증폭 비율을 나타낸 것이다.
 도 5c는 Rv0652를 처리한 수지상 세포의 IFN- γ 의 생성 정도를 나타낸 것이다.
 도 6은 Rv0652를 처리한 수지상 세포 치료제의 암세포 억제 효능을 나타낸 것이다.
 도 7a는 Rv0652를 처리한 수지상 세포 치료제가 CTL 활성화에 미치는 영향을 나타낸 것이다.
 도 7b는 Rv0652를 처리한 수지상 세포 치료제가 비장세포에서 IFN- γ 및 IL-2의 생산에 미치는 영향을 나타낸 것이다.
 도 7c는 Rv0652를 처리한 수지상 세포 치료제가 활성화형 T 세포의 종양으로의 침윤에 미치는 영향을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0040] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예들은 본 발명을 예시하는 것으로 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0041] <실시예 1>

[0042] 수지상 세포 및 결핵균 Rv0652의 준비

[0043] 1.1 수지상 세포의 분리 및 유도

[0044] 수지상세포는 이전에 알려진 방법과 같이 마우스의 골수세포로부터 유도한다.

[0045] 우선 C57BL/6마우스로부터 골수 채취용 주사를 이용해 골수를 채취하였다. 채취한 골수를 세척한 후 적혈구를 염화암모늄을 이용하여 제거하였다. 분리한 세포를 6-웰 플레이트에서 RPMI 1640(10% 열-불활화 FBS, 2 mM L-글루타민, 100 U/ml 페니실린, 100 µg/ml 스트렙토마이신, 5×10^{-5} M 2-ME, 10mM HEPES (pH 7.4), 10 ng/ml GM-CSF, 10 ng/ml IL-4)를 첨가하여 배양하였다. 배양 후 3일과 5일째에는 부유 세포를 제거하고 새로운 배지를 첨가하였다.

[0046] 이후에 기술될 실험들에서는 배양 6일째의 부착되지 않은 수지상 세포를 사용하였다. 일부 실험에서 CD11c⁺ 수지상세포를 항-CD11c(N418) 마이크로비드와 자기 세포 분류 시스템(Vario MACS: Miltenyi Biotec, Auburn, CA)을 이용하여 분리 후 사용하였다. LPS(*E.coli* 055:B 타입, Sigma)는 Rv0652에 대한 양성대조군으로 사용하였다.

[0047] 1.2 결핵균 Rv0652의 제조

[0048] 결핵균 게놈 DNA로부터 Rv0652 유전자를 증폭하기 위한 프라이머의 정방향 쪽에는 *Bam*H I, 역방향 쪽에는 *Eco*RI 제한효소 위치를 넣었다. 정방향 프라이머의 서열은 5'-GGATCCATGGCAAAGCTC-3'(서열번호: 1)이고, 역방향 프라이머의 서열은 5'-GAATTCCTTGACGGT-3'(서열번호: 2)이었다. PCR 유전자 산물을 T-벡터(Promega, Madison, WI, USA)에 클로닝한 후 *Bam*H I과 *Eco*RI으로 절단하고, 발현벡터인 pET28a에 삽입하였다. Rv0652 유전자가 삽입된 pET28a 벡터로 형질 전환시킨 *E. coli* BL-21을 600 nm에서의 흡광도(OD)가 0.4-0.6이 되도록 배양한 후에 1 mM의 이소프로필-D-티오갈락토피라노사이드(IPTG)를 첨가하고 하룻밤 동안 배양하였다. 발현된 단백질은 니켈-니트릴로트라이아세트산(Ni-NTA, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 아가로스를 이용하여 제조사의 방법에 준하여 정제하였다. 정제가 잘 되었는지 확인하기 위해서 SDS-PAGE 및 쿠마시 블루 염색을 이용하였고, 면역블롯팅을 수행했다(도 1a).

[0049] <실시예 2>

[0050] 수지상 세포의 생존율 측정

[0051] LPS 또는 Rv0652로 자극한 수지상 세포의 세포 생존율을 측정하기 위해서, 수지상 세포를 200 ng/ml 농도의 LPS(*E.coli* 055:B, Sigma) 또는 0.5 µg/ml 및 1.0 µg/ml의 Rv0652로 24시간 동안 처리 후에 $5 \mu\text{gml}^{-1}$ 의 요오드화 프로피듐(propidium iodide, PI) 및 아넥신-V로 이중 염색하고 유세포분석기(flow cytometry)를 통해 분석하였다(도 1b).

[0052] 도 1b에 나타난 바와 같이 1.0 µg/ml까지는 수지상 세포에 세포독성이 나타나지 않았으므로 1.0 µg/ml의 Rv0652는 수지상 세포에 독성이 없다고 할 수 있다.

[0053] <실시예 3>

[0054] Rv0652에 의한 수지상 세포의 성숙 정도 분석

[0055] 3.1 보조자극인자와 MHC class I, II의 발현 분석

[0056] 수지상 세포에 0.5 µg/ml 및 1.0 µg/ml 농도의 Rv0652 및 200 ng/ml 농도의 LPS를 각각 24시간 처리한 후 수지상 세포를 회수하였다. 비특이적인 결합을 억제하기 위하여 1 µg/ml의 Fc γ I/III(BD bioscience)을 4℃에서 20분간 처리한 후, 수지상 세포 분석을 위해 CD11c-FITC(BD bioscience)로 4℃에서 20분간 염색하였다. 추가적으로, 보조자극인자와 MHC 분자의 발현 양상을 측정하기 위하여 항-CD80-PE(BD bioscience), 항-CD86-PE(BD bioscience), 항-MHC I 및 II-PE(BD bioscience)를 1 µg/ml 처리하여 4℃에서 30분간 염색했다. PBS 완충액(2% FBS와 0.01% 아지드 나트륨 함유)로 2회 세척하고, 1% 파라포름알데히드로 고정 후에 FACSscan(Beckson Dickinson, USA)로 분석하였다(도 2a).

[0057] 도 2a에 나타난 바와 같이 Rv0652는 수지상 세포의 보조자극인자와 MHC class I, II의 발현을 용량의존적으로 증가시켰다. 그러므로 Rv652는 수지상 세포의 성숙을 유도하여, 수지상 세포의 성숙화의 지표인 다양

한 표면 분자 변화에 영향을 끼침을 알 수 있다.

[0058] **3.2 사이토카인 분비에 미치는 영향 분석**

[0059] Rv0652에 의해 CD11c 수지상 세포내에서 IL-12p40/p70 및 IL-10이 생산되는지 확인하기 위해, 수지상 세포에 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 및 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 Rv0652 및 100 ng/ml 농도의 LPS를 각각 24시간 처리한 후 수지상 세포를 회수하였다. 비특이적인 결합을 억제하기 위하여 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 Fc γ I/III(BD bioscience)을 4℃에서 20분간 처리한 후, 수지상 세포 분석을 위해 CD11c-FITC(BD bioscience)로 4℃에서 30분간 염색하였다. 추가적으로, 세포내 싸이토카인을 염색하기 위해 세포에 항-IL-12p70-PE (BD bioscience) 및 항-IL-10-PE(BD bioscience)를 1 $\mu\text{g/ml}$ 씩 처리하여 4℃에서 30분간 염색했다. PBS 완충액(2% FBS와 0.01% 아지드 나트륨 함유)로 2회 세척하고, 1% 파라포름알데히드로 고정 후에 FACScalibur(Beckson Dickinson, USA)로 분석하였다. 그 결과를 도 2b에 도시하였다. 여기에 각 조건별로 양성인 세포의 비율을 나타내었고, 이는 4번의 개별적 실험의 결과를 나타낸 것이다.

[0060] 도 2b에 나타낸 바와 같이 Rv0652는 CD11c 수지상 세포에서 IL-12pp70의 발현을 용량 의존적으로 증가시켰으며, IL-10의 발현에는 영향이 없었다.

[0061] 또한, 마그네틱 비드로 정제된 수지상 세포에서 IL-12p70, TNF- α , IL-6, IL-1 β 및 IL-10이 생산되는지 여부를 ELISA로 분석하였다(도 2c).

[0062] 도 2c에 나타낸 바와 같이 Rv0652는 수지상 세포에서 IL-12p70, TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 의 발현을 용량 의존적으로 증가시켰다.

[0063] **3.3 수지상 세포의 텍스트란-FITC 탐식능 측정**

[0064] 미성숙 수지상 세포를 0.5 또는 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 의 Rv0652 또는 100 ng/ml LPS의 존재 또는 부재 조건(negative control)에서 24시간 동안 배양하였다. 이 수지상 세포에 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 플루오레신 결합 텍스트란(fluorescein-conjugated dextran, 분자량 40,000; Molecular Probes, Eugene, OR)을 1시간 동안 첨가하였다. 37℃와 4℃에서 각각 30분 동안 배양한 후 쿨드 스테이닝 완충액을 첨가하여 반응을 정지시켰다. 그 다음 세포를 3회 세척한 후에 PE(Phycoerythrin)-결합 CD11c(BD bioscience)로 염색한 후에 FACSCalibur를 이용하여 텍스트란-FITC(Fluorescein isothiocyanate) 탐식능을 측정하였다. 텍스트란의 수지상 세포에 대한 비특이적 결합을 측정하기 위해서 4℃에서도 측정하였다(도 2d).

[0065] 도 2d에 나타낸 바와 같이, Rv0652를 처리한 수지상 세포가 그렇지 않은 것보다 텍스트란(항원) 포식능력이 감소하였다. 이러한 점에서 Rv0652가 기능적인 면에서 수지상 세포를 성숙시킴을 알 수 있다. 텍스트란의 수지상 세포에 대한 비특이적 결합을 측정하기 위해서 4℃에서도 측정하였다.

[0066] **<실시예 4>**

[0067] **Rv0652에 의한 수지상 세포의 성숙과 TLR과의 연관성 분석**

[0068] Rv0652에 의한 수지상 세포를 성숙과 TLR과의 연관성을 보기 위해서 TLR2-/-, TLR4-/- 및 WT 마우스로부터 실시예 1.1과 같은 방법으로 수지상 세포를 분리하였다. 분리한 세포에 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 Rv0652를 1시간 동안 처리한 후 FITC-conjugated Rv0652항체(도 3a)와 Alexa568-conjugated Rv0652항체(도 3b)로 염색하여 TLR2-/-, TLR4-/- 및 WT에서 분리한 수지상 세포에 Rv0652가 결합하는 정도를 확인하였다. Rv0652는 WT과 TLR2-/-에서 분리한 수지상 세포에는 결합이 잘 되지만 TLR4-/-에서 분리한 수지상 세포에는 결합하지 않는 것을 볼 수 있었다(도 3a, 도 3b).

[0069] 또한, 분리된 각 수지상 세포에 대하여 실시예 3.1과 같은 방법으로 CD80, CD86, MHC I 및 MHC II의 발현을 측정하였으며(도 3c), 실시예 3.2와 같은 방법으로 TNF- α 의 생성 정도를 측정하였다(도 3d). Rv0652는 WT 또는 TLR2-/-로부터 분리된 수지상 세포에서 CD80, CD86, MHC I 및 MHC II의 발현과 TNF- α 의 생성을 증가시켰지만, TLR4-/-로부터 분리된 수지상 세포에서는 D86 및 MHC II의 발현과 TNF- α 의 생성이 크게 감소시켰다.

이러한 결과는 Rv0652가 TLR4를 경유하여 수지상 세포를 활성화시켰음을 뒷받침해준다.

[0070] <실시예 5>

[0071] Rv0652가 수지상 세포의 이동 능력에 미치는 영향 분석

[0072] 5.1 CCR7 발현정도 측정

[0073] 각각 1×10^6 세포/ml의 수지상 세포를 포함하는 배지 1ml를 4 그룹으로 나누어서 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 Rv0652, 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 의 Rv0652 및 200 ng/ml 농도의 LPS를 첨가하고 나머지 하나는 음성 대조군으로 아무 처리도 하지 않았다. 24시간 배양한 후, 세포를 회수하였다. 비특이적인 결합을 억제하기 위하여 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 Fc γ I/III을 4℃에서 20분간 처리한 후, 수지상 세포 분석을 위해 CD11c-FITC로 4℃에서 20분간 염색하였다. 그 다음 다시 항 CCR7-PE를 처리하여 4℃에서 30분간 염색하였다. PBS 완충액 (2% FBS와 0.01% 아지드 나트륨 함유)로 2회 세척하고, 1% 파라포름알데히드로 고정 후에 FACScallibur (Beckson Dickinson, USA)로 분석하였다. 그 결과들도 4a에 도시하였다.

[0074] 도 4a에 나타난 바와 같이 Rv0652를 처리하였을 때 처리하지 않은 수지상 세포보다 CCR7의 수치가 증가하였으므로 Rv0652가 수지상 세포의 이동 능력을 증가시킬 것으로 예상할 수 있다.

[0075] 5.2 in vitro 상태에서 주화성 분석

[0076] 정제된 수지상 세포를 24시간 동안 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 의 Rv0652 및 200 ng/ml의 LPS로 처리하거나 하지 않고(음성 대조군), 케모킨 CCL19 (300 ng/mL)에 반응하여 이동하는 것을 측정하였다. 트랜스웰 플레이트(세공 크기 8.0 μm ; Corning, Acton, MA)의 아래쪽 챔버에는 CCL19를 포함하는 것과 포함하지 않는 무혈청(serum-free) 배지를 넣었다. 무혈청 배지에 재현탁된 수지상 세포(0.1 mL 에 1×10^5 세포)를 트랜스웰 플레이트의 위쪽 챔버에 넣고 5% CO_2 하에 37℃에서 3시간 동안 이동하도록 두었다. 아래쪽 챔버에서 거둔 이동한 수지상 세포의 수는 FACS(60-second counts)로 셸다(도 4b).

[0077] 도 4b에 나타난 바와 같이 CCR7의 결합 리간드인 CCL19에 반응해서 이동하는 수지상 세포의 수를 측정 한 결과, Rv0652로 처리한 수지상 세포가 음성 대조군에 비해서 더 많이 이동하였음을 알 수 있었다.

[0078] 5.3. in vivo 상태에서 주화성 분석

[0079] Rv0652 또는 LPS로 처리되어 성숙된 수지상 세포를 0.5 μM CFSE(carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester; Molecular Probes, Eugene, OR) 로 표지하였다. 표지된 세포를 뒷다리의 발바닥에 피하 주입하였다. 72시간 후에 오금의 림프절을 분리하여, 기계적으로 분쇄한 후 콜라게나제 A(1 mg/ml Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) 및 DNase(0.4 mg/ml Roche, Indianapolis, IN)로 30분간 처리하였다. 효소 처리된 세포 현탁액을 FACScalibur 유세포분석기(Becton Dickinson, San Jose, CA)로 분석하였다.

[0080] 도 4c에 나타난 바와 같이 LPS를 처리한 수지상세포와 마찬가지로 Rv0652로 처리한 수지상 세포가 음성 대조군에 비해서 더 많이 이동하였음을 알 수 있었다.

[0081] <실시예 6>

[0082] Rv0652로 처리된 수지상 세포가 T 세포에 미치는 영향 분석

[0083] 동종 T 세포 증식을 촉진하는 능력은 in vitro에서 수지상 세포의 성질이다. 동종 T 세포 자극에 Rv0652가 담지 가능한 영향을 주는지를 확인하기 위해, Rv0652 또는 LPS를 처리하여 수지상 세포 성숙을 유도하기 전과 후의 수지상 세포의 allostimulatory 능력을 비교하였다. 특히, Rv0652에 의한 성숙한 수지상 세포가 특이적으로 CD8+ T 세포의 증식에 영향을 주는지를 확인하기 위해 CD8+ T 세포를 OVA 특이적 OT-1 T 세포 수용체 트랜스제닉 마우스에서 분리하였다. 또한, 정제된 수지상 세포를 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 Rv0652, 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 Rv0652 및 50 ng/ml의 LPS로 처리하거나 처리하지 않고(음성 대조군), 24시간 동안 배양 후 OVA 특이 CD8+ T 세포와의 증

식 여부를 확인하기 위해 Rv0652 및 LPS를 처리한 수지상 세포에 OVA(257-264) 펩타이드를 1시간 동안 자극시킨 후 분리한 OVA 특이 CD8+ T 세포에 CFSE 형광 염료를 염색한 후 4일간 동시 배양하였다.

[0084] 수지상 세포에 의해 자극되어진 T 세포는 수지상 세포(DC)와 클러스터를 형성하게 되는데 DC/T 세포 클러스터의 크기는 미처리된 세포에 의해 형성된 클러스터와 비교해서 Rv0652에 노출된 반응에서 더 증가되었다(도 5a). 또한, T 세포의 증식에 대한 효과는, Rv0652를 처리한 수지상 세포와 배양한 동종 CD8+ T 세포의 증식률이 미처리 수지상 세포와 배양한 T 세포보다 빨라 보였으며, LPS 처리 수지상 세포에서 관찰된 레벨과 유사하였다(도 5b). 이러한 결과는 Rv0652 처리로 유도된 성숙이 미처리된 수지상 세포의 allostimulatory 능력을 현저히 증가시켰음을 뒷받침해준다.

[0085] 수지상 세포에서 Rv0652의 IL-12 (사이토카인을 포함하는 Th1) 생성에 대한 촉진 효과를 확인하기 위해, Rv0652 존재 하에 성숙된 수지상 세포에서 초기의 T 세포 반응의 특성을 조사하였다. 전술된 바와 같은 방법으로 수지상 세포와 T세포를 배양한 후 동시 배양 2일째에 배양액을 수거해 Th1 반응을 촉진하는 IFN- γ 의 생성정도를 ELISA 방법으로 측정하였다. Rv0652에 의해 성숙된 수지상 세포는 CD8+ T 세포내 IFN- γ 생성을 증가시켰다(도 5c).

[0086] <실시예 7>

[0087] 암세포 억제 실험

[0088] 8 마리의 C57BL/6 마우스에 EL4 세포와 E.G7 (OVA 과발현 EL4) 세포를 3×10^5 만큼 주사하여 7일 동안 암세포가 자라게 하였다. $1 \mu\text{g/ml}$ 농도의 Rv0652로 24시간 처리한 후에 다시 $1 \mu\text{M}$ 농도의 OVA로 처리하여 2시간 동안 배양한 수지상 세포를 종양을 가진 C57BL/6마우스에 각 마리당 1×10^6 세포/ $100\mu\text{l}$ (in PBS)으로 1주간격으로 2회 복강에 주사하였다. 대조군으로, 무처리 수지상 세포, OVA 처리만 한 수지상 세포 및 PBS를 각각 마우스에 주사하였다. 최종 주사 후 2일 간격으로 20일간 종양의 크기를 측정하였다. 그 결과를 도 6에 도시하였다.

[0089] Rv0652와 OVA를 처리한 수지상 세포를 투여 받은 그룹에서 다른 그룹에서보다 종양의 크기가 훨씬 작은 것을 확인할 수 있었다. 또한, 수지상 세포를 투여한 후 시간이 지날수록, Rv0652와 OVA를 처리한 수지상 세포를 투여한 경우에 종양 크기의 성장이 가장 두드러지게 둔화됨을 확인할 수 있다.

[0090] <실시예 8>

[0091] 숙주의 T 세포 반응에 대한 Rv0652의 영향 분석

[0092] 8.1. 생체외(Ex vivo) CTL 활성 분석

[0093] 숙주의 T 세포 반응에 대한 Rv0652의 영향을 평가하기 위해, IFN- γ 및 IL-2의 생산을 분석하였다. BALB/c 마우스에 PBS, 무처리 수지상 세포, OVA₂₅₇₋₂₆₄로 처리된 수지상 세포 또는 OVA₂₅₇₋₂₆₄ 및 Rv0652로 처리된 수지상 세포를 1일 및 7일째에 투여하였다. 10일째에 상기 마우스로부터 비장세포를 분리하여 6구판에서 7일 동안 $10\mu\text{g/ml}$ 의 OVA로 처리한 후 EL4 [1×10^6 , 0.5 mM CFSE-stained (CFSE^{low})] 및 E.G7 [1×10^6 , 10 mM CFSE-stained (CFSE^{high})] 세포와 공배양하였다. 2일 후 혼합된 림프구 종양 배양물을 유세포분석기로 분석하였다.

[0094] 도 7a에 나타낸 바와 같이 OVA 및 Rv0652로 처리된 수지상 세포는 생체외에서 OVA 특이적 CTL 활성화를 증가시켰다. OVA로 처리된 수지상 세포가 주입된 마우스로부터 분리된 CTLs는 E.G7-OVA 타겟 세포를 효과적으로 용균할 수 있었지만, PBS, 미성숙 수지상 세포 또는 OVA로 처리되지 않은 수지상 세포가 주입된 마우스의 CTLs는 타겟 세포를 효과적으로 용균하지 못하였다. OVA 및 Rv0652로 처리된 수지상 세포가 주입된 마우스로부터 분리된 CTLs는, E.G7에서, OVA로 처리된 수지상 세포가 주입된 마우스로부터 분리된 CTLs 보다 타겟 세포를 현저히 빠른 속도로 용균하였다.

8.2. IFN- γ 및 IL-2 생산량 분석

숙주의 T 세포 반응에 대한 Rv0652의 영향을 평가하기 위해, IFN- γ 및 IL-2의 생산을 분석하였다. BALB/c 마우스에 PBS, 무처리 수지상 세포, OVA로 처리된 수지상 세포 또는 OVA 및 Rv0652로 처리된 수지상 세포를 1일 및 7일째에 투여하였다. 최종 주입 후 7일째에 비장세포를 분리하여 구판에 구당 2×10^6 세포로 넣고 $10\mu\text{g/ml}$ 의 OVA로 24시간 동안 다시 자극하였다. 그리고, 세포 상층액을 분리하여 ELISA로 IFN- γ 및 IL-2의 양을 측정하였다.

도 7b에 나타난 바와 같이, OVA 및 Rv0652로 처리된 수지상 세포가 주입된 마우스로부터 분리된 비장세포는 OVA로 다시 자극받았을 때 OVA로 처리된 수지상 세포 보다 더 많은 양의 IFN- γ 및 IL-2를 분비함을 확인할 수 있었다. 이는 Rv0652로 처리된 수지상 세포의 항종양 효과가 CTL의 활성화 뿐 아니라 IFN- γ 와 IL-2의 생산을 자극하는 것과 밀접하게 관련되어 있음을 보여준다. 이러한 결과는 Rv0652가 Th1 분극화(polarizing) 아주변트로서 작용함을 뒷받침한다.

8.3. 활성화된 T 세포의 종양에서의 침윤 정도 분석

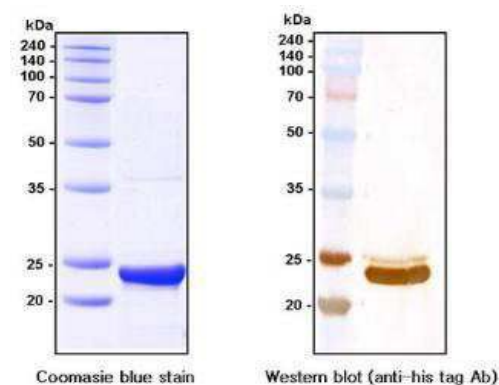
실시에 7과 같이 준비된 마우스 종양 모델로부터 마지막 주사 후 20일이 지난 다음 암을 떼어내어 T 세포를 분리하였다. 분리한 세포들을 CD69-PE와 CD8-FITC로 염색한 후 FACS로 측정하였다.

도 7c에 나타난 바와 같이 Rv0652 처리된 수지상 세포의 투여가 종양으로 활성화된 CD8^+ T 세포의 표현형인 $\text{CD8}^+\text{CD69}^+$ T 세포의 수를 증진시킬 수 있는지 여부를 조사하였다. 활성화된 CD8^+ T 세포의 수는 PBS 또는 무처리 수지상 세포가 주입된 마우스에서 극히 낮은 반면, Rv0652로 처리된 수지상 세포가 주입된 마우스에서는 높았다. 이러한 결과는 Rv0652로 처리된 수지상 세포가 종양에서 CTL의 활성화 유도 뿐 아니라 CD8^+ T 세포 침윤의 증가를 통해 항종양 면역 반응을 유도함을 의미한다.

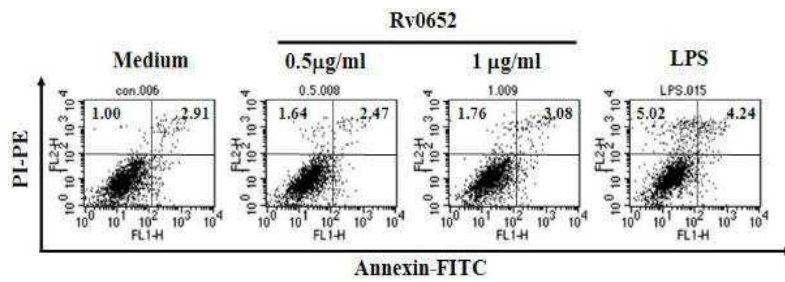
이상 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예들을 설명하였지만, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 그 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

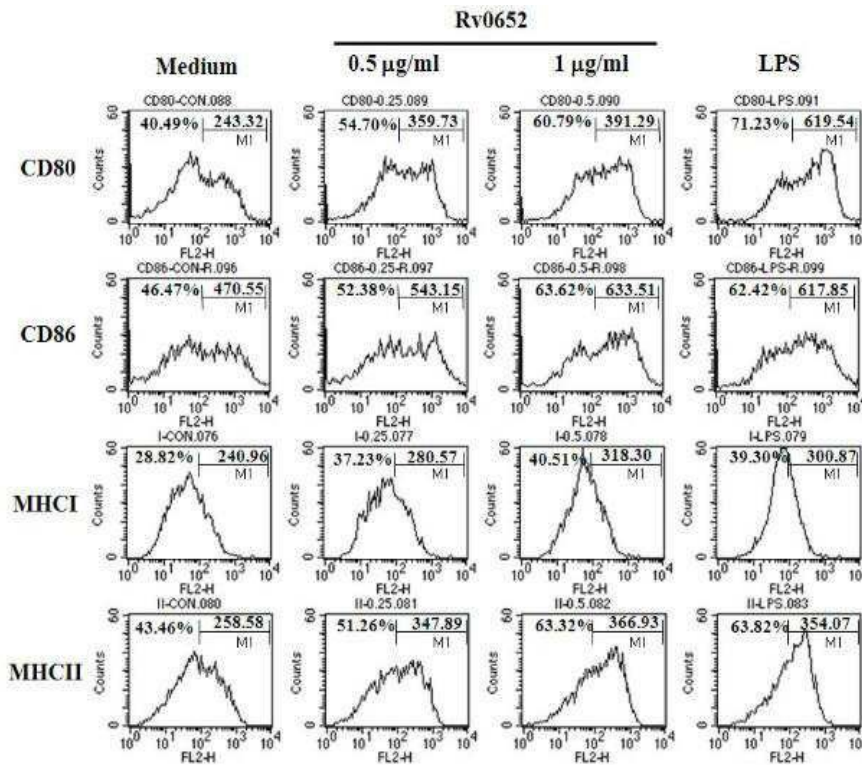
도면1a



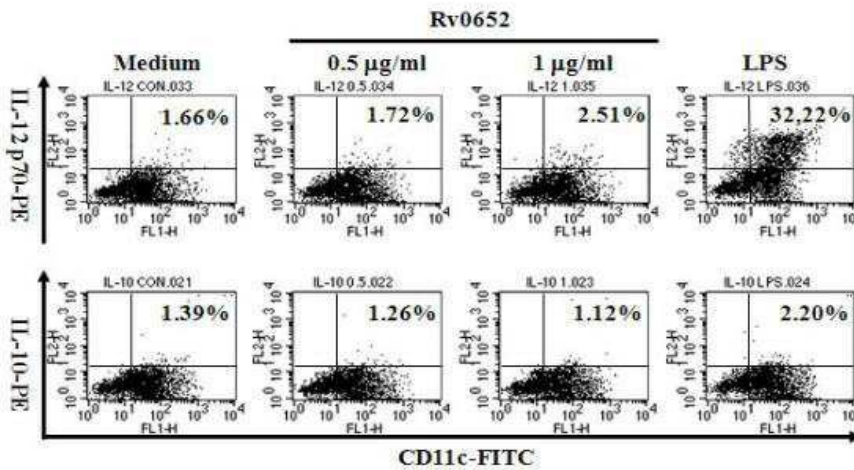
도면1b



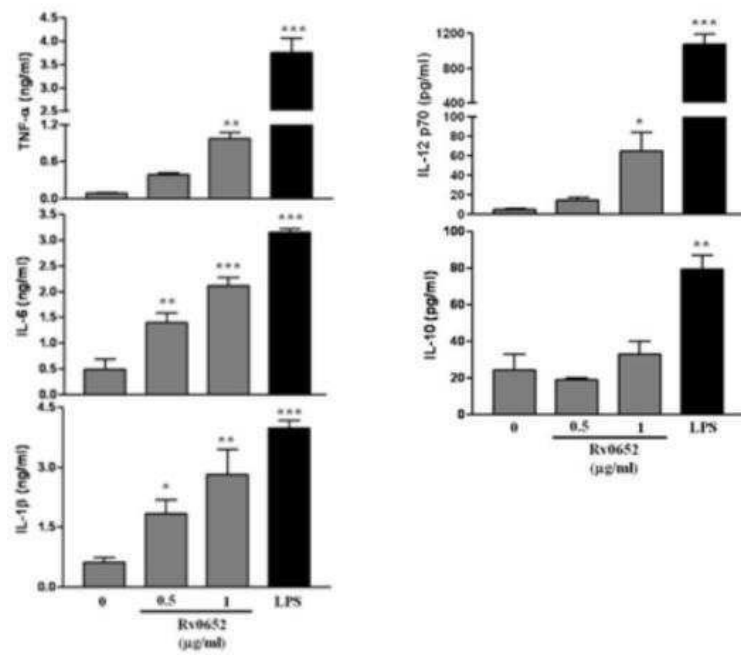
도면2a



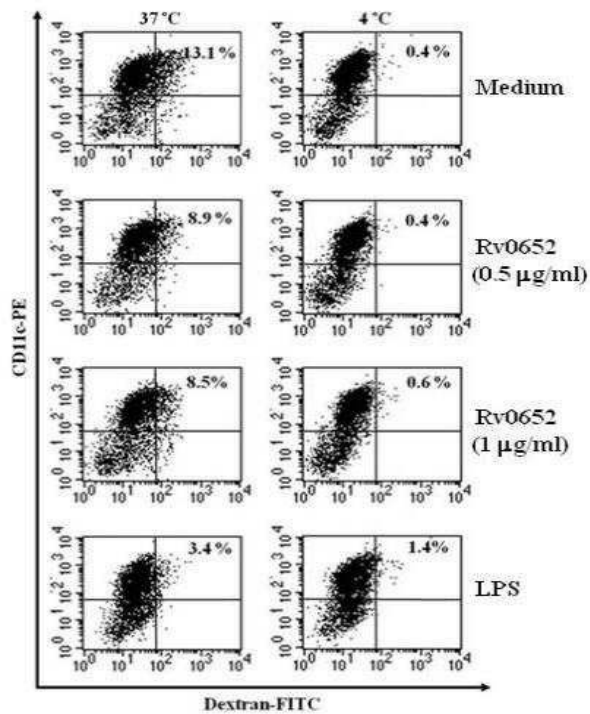
도면2b



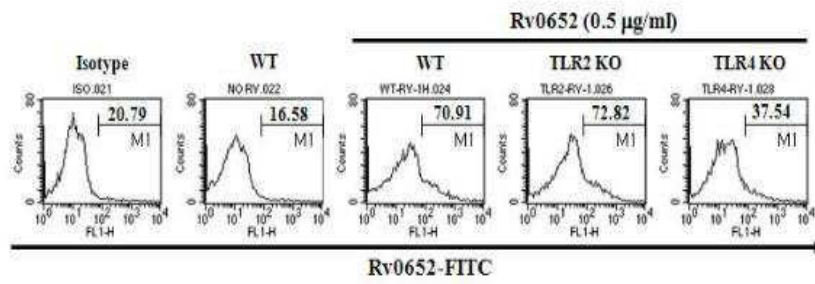
도면2c



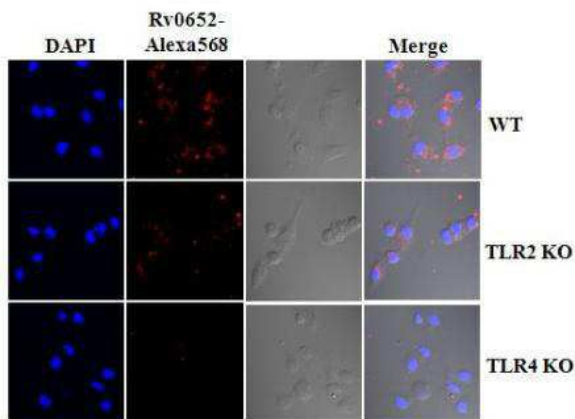
도면2d



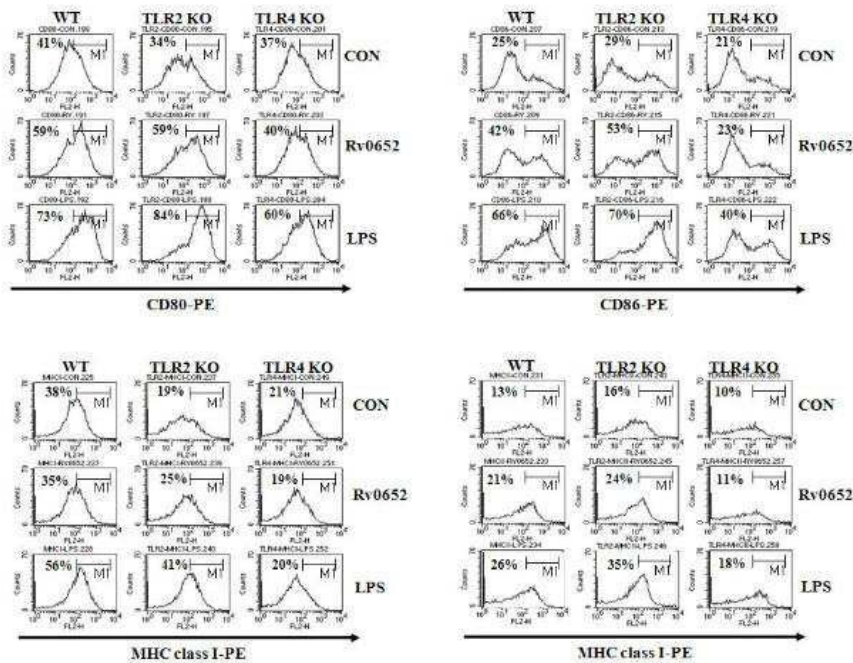
도면3a



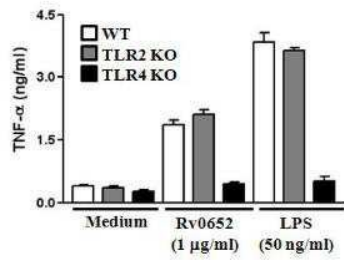
도면3b



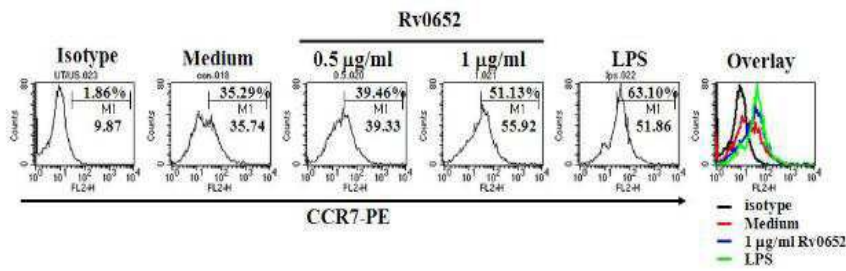
도면3c



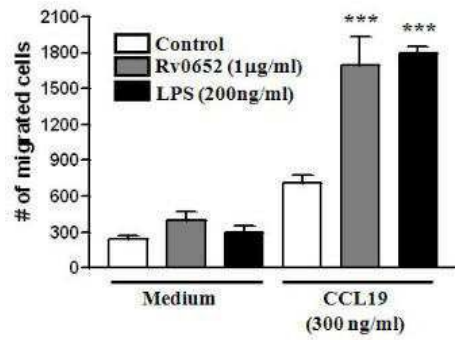
도면3d



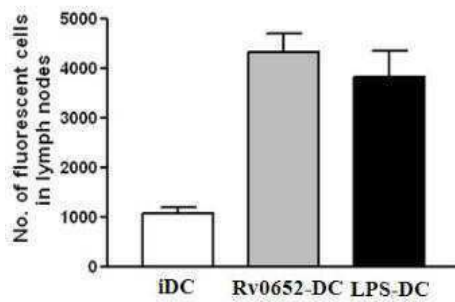
도면4a



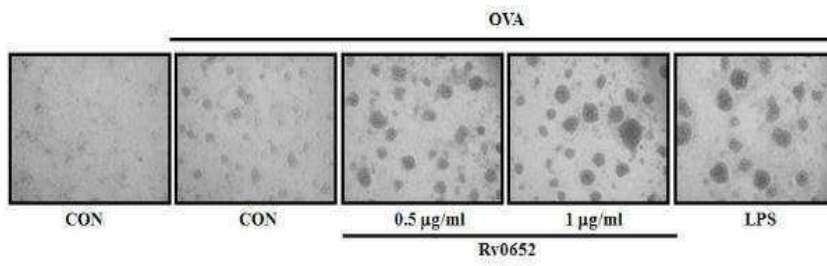
도면4b



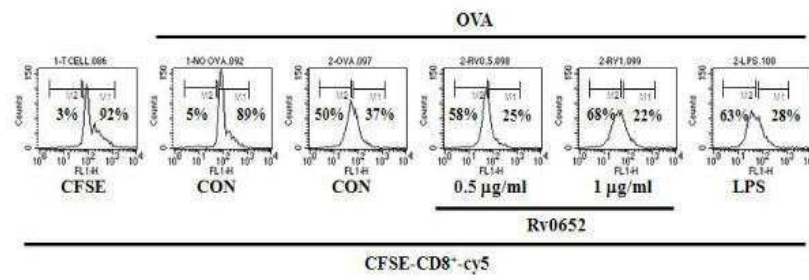
도면4c



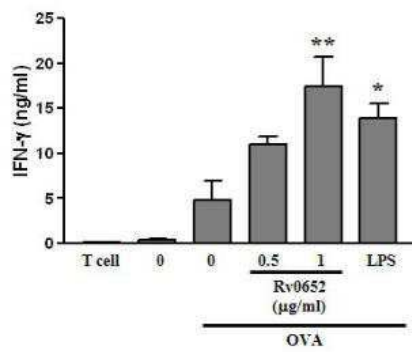
도면5a



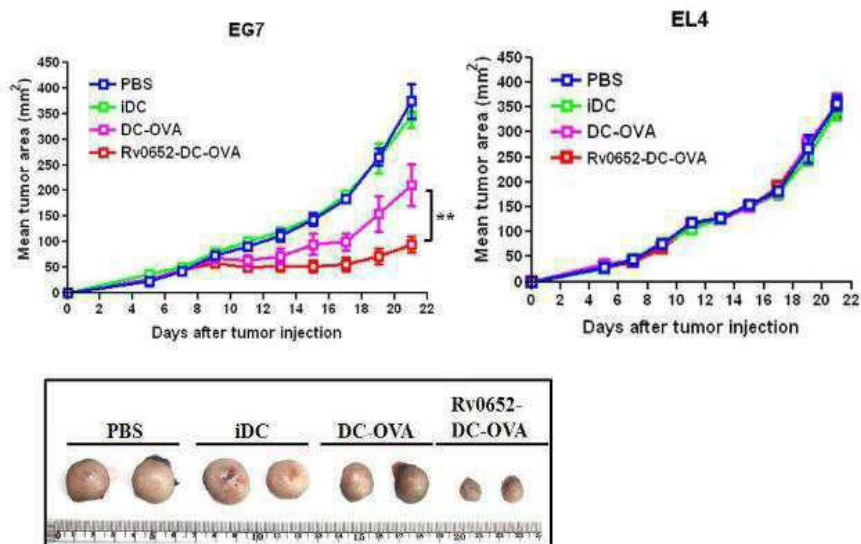
도면5b



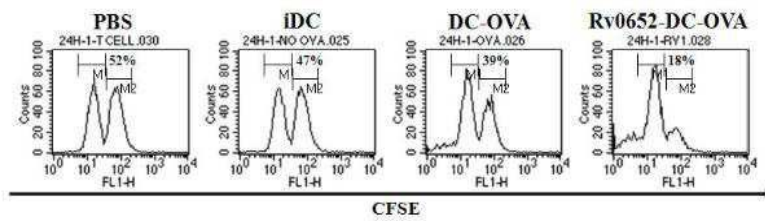
도면5c



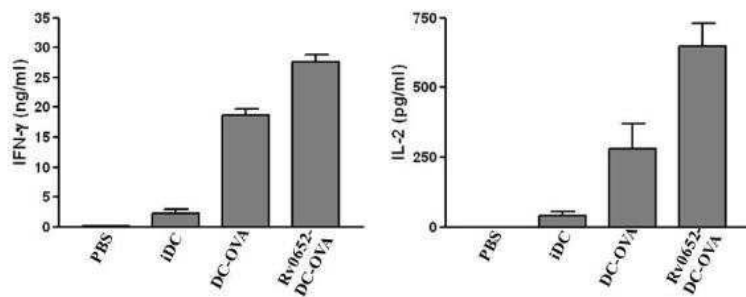
도면6



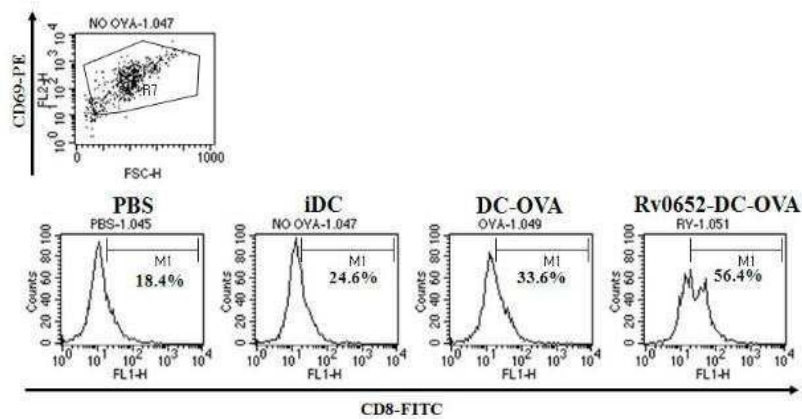
도면7a



도면7b



도면7c



서열 목록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)

<120> Dendritic cell based cancer medicine using M. tuberculosis Rv0652 protein as an adjuvant

<160> 2

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for Rv0652

<400> 1

ggatccatgg caaagctc

18

<210> 2

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for Rv0652

<400> 2

gaattccttg acggt

15