



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0006209
(43) 공개일자 2018년01월17일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0789 (2010.01) A61K 31/7105 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C12N 5/0647 (2013.01)
A61K 31/7105 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2016-0087053
(22) 출원일자 2016년07월08일
심사청구일자 2016년07월08일</p> | <p>(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)</p> <p>(72) 발명자
전태훈
서울특별시 송파구 양재대로 1218, 236동 1802호 (방이동, 올림픽선수기자촌아파트)</p> <p>배준범
경기도 고양시 일산동구 고봉로 72-41, 505동 1201호(풍동, 성원상떼빌5차아파트)</p> <p>(74) 대리인
김순용</p> |
|--|---|

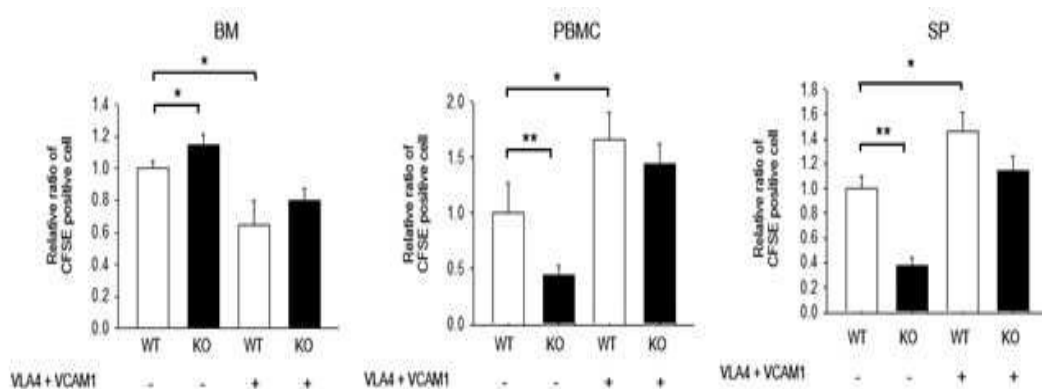
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 Phc2 유전자의 발현 억제제를 포함하는 조혈모세포의 이동 조절용 조성물

(57) 요약

본 발명은 VCAM-1 유전자의 발현 억제제 또는 VCAM-1 단백질의 활성 억제제를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 VCAM-1 유전자의 발현 억제제 또는 VCAM-1 단백질의 활성 억제제는 조혈모세포의 골수로부터 말초 혈류 및 말초 조직으로의 이동을 촉진하고 동시에 기질세포와 조혈모세포 간의 세포부착을 억제함으로써 면역세포 감소증을 억제시킬 수 있다. 더 나아가 조혈모세포의 수득이 용이해지므로 조혈모세포 이식이 필요한 혈액 유래질환의 치료에도 활용할 수 있다.

대 표 도 - 도13



(52) CPC특허분류

A61K 39/395 (2013.01)

C12N 2501/58 (2013.01)

C12N 2501/585 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ01113001

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 동물유전체육종사업단

연구사업명 차세대바이오그린21사업

연구과제명 돼지 소모성질병 제어를 위한 PCV2와 숙주세포 간의 면역 조절 기전 구명

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2016.01.01 ~ 2016.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

VCAM-1(vascular cell adhesion molecule-1) 유전자의 발현 억제제 또는 VCAM-1 단백질의 활성 억제제를 포함하는 조혈모세포 이동 촉진용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 이동은 골수에서 말초 혈류 또는 말초 조직으로의 이동인 것을 특징으로 하는, 조혈모세포 이동 촉진용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 발현 억제제는, VCAM-1 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, 짧은 헤어핀 RNA(small hairpin RNA, shRNA), 작은 간섭 RNA(small interfering RNA, siRNA) 및 리보자임(ribozyme)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 조혈모세포 이동 촉진용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 활성 억제제는, VCAM-1 단백질 또는 이의 인테그린(integrin)에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 앵타머, 및 항체로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 조혈모세포 이동 촉진용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 항체는 항 VCAM-1 또는 항 VLA-4(Integrin $\alpha 4\beta 1$)인 것을 특징으로 하는, 조혈모세포 이동 촉진용 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 VCAM-1 유전자의 발현 억제제 또는 VCAM-1 단백질의 활성 억제제는 기질세포와 조혈모세포간 세포부착능을 억제하는 것을 특징으로 하는, 조혈모세포 이동 촉진용 조성물.

청구항 7

VCAM-1 유전자의 발현 억제제 또는 VCAM-1 단백질의 활성 억제제를 포함하는 면역세포 감소증 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 면역세포 감소증은 말초 혈류 또는 말초 조직에서 면역세포가 감소하는 것을 특징으로 하는, 면역세포 감소증 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 면역세포는 T 림프구, B 림프구 및 대식세포로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 세포인 것을 특징으로 하는, 면역세포 감소증 치료용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 VCAM-1 유전자의 발현 억제제 또는 VCAM-1 단백질의 활성 억제제를 포함하는 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 세포가 발달 및 분화하는 과정에서 다양한 기작에 의하여 많은 유전자의 발현이 억제 또는 개시된다. 이처럼 세포의 발달 상태에 따라 유전자의 발현이 조절되고 유지되는 것을 후성학적 유전(epigenetics)이라 한다. 이러한 후성 유전학적 요인으로 인해 동일한 유전자형을 가진 일란성 쌍둥이라도 외부적인 환경에 따라서 서로 다른 유전형질을 나타낼 수 있다는 것이 설명될 수 있다.

[0004] 크로마틴의 구조는 유전정보를 담고 있는 DNA와 그와 결합하는 단백질간의 상호작용 변화에 따라서 달라지며, 이러한 크로마틴 변형으로 인해 특정 유전자의 전사가 달라질 수 있다. 후생학적 유전을 조절하는 기작으로는 대표적으로 DNA 메틸화 및 아세틸화를 들 수 있다. 최근 여러 연구를 통해서 이러한 후성유전적 변이는 암 및 다양한 면역질환의 발생과 상당한 관련이 있는 것으로 밝혀졌다. 세포의 분화 및 여러 질병의 발생과 관련하여 후성유전학의 중요성이 인식되면서 현재 후성유전체에 대한 많은 연구가 진행되고 있다.

[0005] 유전자에 결합하여 유전자의 전사를 막음으로써 유전자의 침묵(gene silencing)을 유도하는 단백질군이 있는데, 이를 폴리콤 그룹(Polycomb group; PcG)이라고 한다(Sauvageau and Sauvageau, 2010). 폴리콤 그룹 단백질들은 초과리에서 처음 발견되었으며 염색질에 결합하는 복합체 형태(chromatin-associated multimeric complex)를 이루고 있는 것이 특징이며, 특정 히스톤 부분에 메틸기나 유비퀴틴을 붙여서 히스톤 및 크로마틴의 구조 변화를 일으키는 것으로 알려져 있다. PcG 복합체는 크게 두 부류로 나뉘어지는데, 하나는 폴리콤(PC) 및 Phc2를 포함하는 PRC1 복합체(Polycomb repressive complex 1)이고 나머지 하나는 PRC2 복합체이다.

[0006] PcG 복합체는 BMI-1, MEL-18, PHC1, Ring1B와 같은 PRC2 단백질 복합체를 구성하는 단위 단백질들을 제거한 생쥐에서 면역세포의 분화 및 활성화에 문제를 일으킨다고 알려져 있다. 지금까지의 연구의 대부분은 PcG 단백질 복합체중 BMI-1, MEL-18, EZH2 의 기능에 대해서만 국한되어 있으며, 다른 단위 단백질들이 면역세포 분화 및 활성화에 어떠한 영향을 미치는가에 대해서는 연구가 미비한 실정이다.

[0007] 한편, phc2 유전자는 다른 폴리콤 그룹 단백질들과 복합체를 이루면서 목적 유전자의 발현을 억제하며 PRC2 복합체가 DNA나 히스톤을 인식하여 유전자 억제를 개시하는 것으로부터 그 기작이 작동되는 것으로 알려져 있으나 이에 대한 연구는 거의 진행된 바 없다.

[0008] 본 발명자들은 조혈모세포 이동 축진을 위하여, PcG의 일종인 Phc2 단위 단백질이 면역세포 분화 및 활성화에 미치는 영향에 대해 연구하던 중 phc2 적중 마우스의 말초 혈류 또는 말초 조직에서 나타나는 면역세포 감소증이 내부적인 결핍 때문이 아닌 골수의 미세환경에서 나타나는 조혈모세포의 골수에서 말초 혈류 또는 말초 조직으로의 이동장애 및 세포부착장애에 의한 것이며, 구체적으로 phc2 유전자 적중 마우스의 골수의 미세환경을 차지

하고 있는 기질세포에 과발현되거나 과활성화된 VCAM-1에 의한 것임을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) KR 특허 출원 번호 제10-2013-0089471호
(특허문헌 0002) KR 특허 출원 번호 제10-2015-0059565호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명의 목적은 VCAM-1(vascular cell adhesion molecule-1) 유전자의 발현 억제제 또는 VCAM-1 단백질의 활성 억제제를 포함하는 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 VCAM-1(vascular cell adhesion molecule-1) 유전자의 발현 억제제 또는 VCAM-1 단백질의 활성 억제제를 포함하는 조혈모세포 이동 촉진용 조성물을 제공한다.
- [0014] 또한, 본 발명은 VCAM-1 유전자의 발현 억제제 또는 VCAM-1 단백질의 활성 억제제를 포함하는 면역세포 감소증 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0016] 본 발명에 따른 VCAM-1 유전자의 발현 억제제 또는 VCAM-1 단백질의 활성 억제제는 조혈모세포의 골수로부터 말초 혈류 및 말초 조직으로의 이동을 촉진하고 동시에 기질세포와 조혈모세포 간의 세포부착을 억제함으로써 면역세포 감소증을 억제시킬 수 있다. 더 나아가 조혈모세포의 수득이 용이해지므로 조혈모세포 이식이 필요한 혈액유래질환의 치료에도 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0018] 도 1은 정상 생쥐(WT)와 phc2 유전자 적중 생쥐(KO)의 골수(BM), 흉선(Thy), 비장(SP), 간(Liver)에서의 면역세포 수를 나타내는 도이다.
- 도 2는 정상 생쥐(WT)와 phc2 유전자 적중 생쥐(KO)의 비장에서 관찰된 T 림프구(TCR β +), B 림프구(B220+), 대식세포(CD11b+)의 비율을 나타내는 도이다.
- 도 3은 정상 생쥐(WT)와 phc2 유전자 적중 생쥐(KO)의 골수(BM), 비장(spleen) 및 PBMC 내의 조혈모 세포의 분화를 균총 형성 단위 분석(CFU assay)을 통해 확인한 결과를 나타내는 도이다.
- 도 4a는 정상 생쥐(WT)와 phc2 유전자 적중 생쥐(KO)의 골수세포를 방사선 조사한 B6 백그라운드 생쥐에 주사한 후 골수(BM), 흉선(thy), 비장(SP)에서의 면역세포 수를 나타내는 도이다.
- 도 4b는 정상 생쥐(WT)와 phc2 유전자 적중 생쥐(KO)의 골수세포를 방사선 조사한 B6 백그라운드 생쥐에 주사한 후 비장에서 T 림프구 (TCR β +), B 림프구(B220+), 대식세포(CD11b+)의 수를 비교한 결과를 나타내는 도이다.
- 도 4c는 B6 백그라운드 생쥐의 골수세포를 방사선 조사한 정상 생쥐(WT)와 phc2 유전자 적중 생쥐(KO)에 주사한 후에 골수(BM), 흉선(thy), 비장(SP)에서의 면역세포 수를 나타내는 도이다.
- 도 4d는 B6 백그라운드 생쥐의 골수세포를 방사선 조사한 정상 생쥐(WT)와 phc2 유전자 적중 생쥐(KO)에 주사한

후 비장에서 T 림프구(TCR β +) , B 림프구(B220+) , 대식세포(CD11b+)의 수를 비교한 결과를 나타내는 도이다.

도 5는 정상 생쥐(WT) 또는 phc2 유전자 적중 생쥐(KO)의 골수유래 기질세포(stromal cell)와 CFSE가 형광 라벨링된 정상 생쥐(WT) 또는 phc2 유전자 적중 생쥐(KO) 유래 조혈모세포(HSC)를 함께 배양한 후, 기질세포에 부착된 조혈모세포의 상대적인 비율을 확인한 결과를 나타내는 도이다.

도 6은 정상 생쥐(WT)와 phc2 유전자 적중 생쥐(KO)의 골수유래 기질세포를 트랜스웰(transwell)의 인서트(insert) 부분에 시딩하고, 정상 생쥐(WT)와 phc2 유전자 적중 생쥐(KO) 유래 조혈모세포의 트랜스웰 이동 분석(transwell migration assay)를 수행하여, 기질세포층을 지나쳐서 트랜스웰 바닥부분으로 이동한 조혈모세포의 상대적인 비율을 비교한 결과를 그래프로 나타내는 도이다.

도 7은 정상 생쥐(WT)와 Phc2 유전자 적중 생쥐(KO)의 골수세포를 추출하여 CFSE를 라벨링한 뒤, 골수세포에 방사선 조사한 정상 생쥐(WT)와 phc2 유전자 적중 생쥐(KO)에게 각각 주사한 후, 유세포분석법을 통해 마우스의 골수에서 CFSE 양성 면역세포를 비교한 결과를 나타내는 도이다.

도 8은 기질세포에서 조혈모세포의 이동에 영향을 주는 SDF-1, Ang1, KitL, cathepsin K, ICAM1, ALCAM, P-selection, VCAM-1의 발현을 실시간 PCR(real time-PCR)로 분석한 결과를 나타내는 도이다.

도 9는 정상 생쥐(WT)와 phc2 유전자 적중 생쥐(KO) 유래 골수 및 기질세포에서 VCAM-1의 발현을 항 VCAM-1 항체를 이용한 웨스턴 블롯(western blot)을 통해 확인한 결과를 나타내는 도이다.

도 10은 정상 생쥐(WT)와 phc2 유전자 적중 생쥐(KO) 유래 골수세포로부터 추출한 크로마틴 DNA를 phc2 항체를 이용하여 칩 분석(chip assay)을 수행한 결과를 나타내는 도이다.

도 11은 정상 생쥐(WT)와 phc2 유전자 적중 생쥐(KO)의 골수 유래 기질세포에 CFSE로 형광 라벨링한 정상 생쥐(WT)와 phc2 유전자 적중 생쥐(KO) 유래 조혈모세포(HSC)를 함께 배양한 후, VCAM-1 중화항체와 VLA-4 중화항체의 처리 유무에 따른 기질세포에 부착된 조혈모세포의 상대적인 비율을 확인한 결과를 나타내는 도이다.

도 12는 정상 생쥐(WT)와 phc2 유전자 적중 생쥐(KO)의 골수 유래 기질세포를 트랜스웰의 인서트 부분에 시딩하고, VCAM-1 중화항체와 VLA-4 중화항체의 처리 유무에 따른 정상 생쥐(WT)와 phc2 유전자 적중 생쥐(KO) 유래 조혈모세포의 트랜스웰 이동 분석을 수행하여, 기질세포층을 지나쳐서 트랜스웰 바닥부분으로 이동한 조혈모세포의 상대적인 비율을 비교한 결과를 나타내는 도이다.

도 13은 정상 생쥐(WT)와 phc2 유전자 적중 생쥐(KO)의 골수세포를 추출하여 CFSE로 형광 라벨링한 뒤, 골수세포를 방사선 조사한 정상 생쥐(WT)와 phc2 유전자 KO 생쥐에게 각각 주사한 후, VCAM-1 중화항체와 VLA-4 중화항체의 처리 유무에 따른 마우스의 골수에서 CFSE 양성 면역세포를 비교한 결과를 나타내는 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 본 발명은 VCAM-1(vascular cell adhesion molecule-1) 유전자 발현 억제제 또는 VCAM-1 단백질의 활성 억제제를 포함하는 조혈모세포 이동 촉진용 조성물을 제공한다.
- [0020] 이하, 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.
- [0021] 본 발명에서 'VCAM-1(vascular cell adhesion molecule-1)'은 중성구(neutrophil)를 제외한 모든 백혈구 표면에 발현되는 인테그린(VLA-4) 등과 상호작용하는 혈관 내피세포 접착 분자(vascular endothelial cell adhesion molecule)의 일종으로서, 염증 신호 등에 의해 백혈구의 혈관 내피세포로의 부착을 고정시켜 이후 백혈구의 상처 부위로의 이동에 관여한다.
- [0022] 본 발명에 있어서, VCAM-1 유전자는 NCBI 허가번호 NM_011693.3 또는 NM_001078.3 등에 개시된 것을 포함하고, VCAM-1 단백질은 NCBI 허가번호 NP_035823.3 또는 NP_001069.1 등에 개시된 것을 포함하며, 동일 또는 유사한 기능을 갖는 상기 유전자 또는 단백질의 변이체가 본 발명의 범위에 포함될 수 있고, 이에 제한되지 않는다.
- [0023] 본 발명에서 '조혈모세포'는 다양한 혈액 세포 유형, 예를 들어 B 세포, T 세포, 과립구, 혈소판 및 적혈구로 발달할 수 있는 줄기세포이다.
- [0024] 본 발명에서 '세포 이동 촉진용 조성물'은 세포 이동을 촉진 또는 자극하기 위해 이용되는 세포 이동 촉진 활성을 갖는 제제로, 세포 이동 자극제, 세포 이동 촉진제, 세포 이동을 유도하기 위해 이용되는 조성물, 세포 이동을 유도하기 위해 이용되는 제제, 세포 이동 유도제, 또는 세포 유도제라고도 표현된다.

- [0025] 상기 '세포 이동 촉진 활성'은 세포 이동을 촉진 또는 자극하는 활성을 의미하며, 세포 이동 촉진 활성은 세포 이동 유도 활성 또는 세포 유도 활성으로도 표현된다.
- [0026] 상기 '이동'은 조혈모세포가 이동하는 경로를 모두 포함하며, 바람직하게는 조혈모세포의 골수에서 말초 혈류 또는 말초 조직으로의 이동일 수 있다.
- [0027] 본 발명은 VCAM-1 유전자의 발현 또는 VCAM-1 단백질의 활성을 억제함으로써 조혈모세포의 이동을 촉진하여 혈류 내 조혈모세포의 수를 증가시키고, 이에 따라 조혈모 세포가 손쉽게 채취할 수 있게 됨으로써 조혈모세포 이식을 통한 질병 치료를 보다 용이하게 수행할 수 있는 것이 특징이다.
- [0028] 본 발명의 조성물은 상기 VCAM-1 유전자의 발현 억제제 또는 VCAM-1 단백질의 활성 억제제와 함께 VCAM-1 발현 또는 활성 억제 효과를 갖는 공지의 유효성분 또는 조혈모세포 이동 촉진 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.
- [0029] 본 발명에 따른 VCAM-1 유전자의 발현 억제제는 VCAM-1 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, 짧은 헤어핀 RNA(small hairpin RNA, shRNA), 작은 간섭 RNA(small interfering RNA, siRNA) 및 리보자임(ribozyme)으로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상 일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0030] 본 발명에 따른 VCAM-1 단백질의 활성 억제제는 VCAM-1 단백질 또는 이의 인테그린(integrin)에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 모방체, 기질 유사체, 앵타머 및 항체로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0031] 상기 안티센스 뉴클레오티드는 왓슨-크릭(Watson-Crick) 염기쌍에 정의된 바에 따라, DNA, 미성숙-mRNA 또는 성숙된 mRNA의 상보적 염기서열에 결합(혼성화)하여 DNA에서 단백질로서 유전정보의 흐름을 방해하는 것이다.
- [0032] 상기 siRNA는 VCAM-1 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA의 염기서열 내에서 선택되는 15 내지 30머(mer)의 센스서열 및 상기 센스 서열에 상보적으로 결합하는 안티센스 서열로 구성되며, 이때, 상기 센스 서열은 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0033] 상기 화합물은 VCAM-1 단백질 또는 이의 인테그린에 특이적으로 결합하여 이의 활성을 억제할 수 있는 임의의 화합물을 모두 포함한다.
- [0034] 상기 앵타머(aptamer)는 단일 사슬 DNA 또는 RNA 분자로서, SELEX(systematic evolution of ligands by exponential enrichment)라 불리는 올리고 뉴클레오티드 (oligonucleotide) 라이브러리를 이용한 진화적인 방법에 의해 특정 화학 분자나 생물학적 분자에 높은 친화력과 선별력을 갖고 결합하는 올리고머를 분리하여 수득할 수 있다. 앵타머는 표적에 특이적으로 결합하고 표적의 활성을 조절할 수 있는데, 예컨대, 결합을 통하여 표적의 기능을 차단할 수 있다.
- [0035] 상기 항체는 VCAM-1 단백질 또는 이의 인테그린에 특이적이고 직접적으로 결합하여 VCAM-1 단백질의 활성을 효과적으로 억제할 수 있다. 상기 VCAM-1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체로는 폴리클로날(polyclonal) 항체 또는 모노클로날(monoclonal) 항체를 사용하는 것이 바람직하며, 상기 항체는 항 VCAM-1 또는 항 VLA-4일 수 있다. 상기 항 VCAM-1 또는 항 VLA-4는 당업자에게 알려진 공지의 방법으로 제작할 수도 있으며, 상업적으로 알려진 항 VCAM-1 또는 항 VLA-4를 구입하여 사용할 수 있다. 바람직하게는 항 VCAM-1은 BD biosciences사의 카탈로그 넘버 553329의 항체를 포함하고, 항 VLA-4는 Millipore사의 카탈로그 넘버 CBL 1304의 항체를 포함한다.
- [0036] 보다 구체적으로 본 발명의 '항 VLA-4'는 VLA-4($\alpha 4\beta 1$ 인테그린)의 중화항체를 포함한다. 상기 VLA-4는 염증 부위의 내피 세포상에서 자주 상향 조절되는 VCAM-1(혈관 세포 유착 분자-1)로 일컬어지는 유착 분자에 결합하는 인테그린으로, VLA-4의 독특한 에피토프들이 피브로넥틴 및 VCAM-1 결합 활성을 담당하며, 이들 각각은 독립적으로 억제된다.
- [0037] 상기 VCAM-1 유전자 발현 억제제 또는 VCAM-1 단백질 활성 억제제는 기질세포와 조혈모세포간 세포부착능을 억제하는 효과를 가진다. 세포 부착능 감소로 인하여 조혈모세포의 골수에서 말초 혈류 또는 말초 조직으로의 이동이 촉진되므로 조혈모세포 이식에서 효과적인 이식 및 치료를 위한 조혈모세포의 확보가 용이해진다.
- [0038] 또한, 본 발명은 VCAM-1 유전자 발현 억제제 또는 VCAM-1 단백질의 활성 억제제를 포함하는 면역세포 감소증 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0039] 본 발명의 약학적 조성물에 포함되는 VCAM-1 유전자 발현 억제제 또는 VCAM-1 단백질 활성 억제제의 함량은, 치

료제의 사용방법, 복용자의 상태, 질환의 종류 및 중증 정도에 따라 적절히 조절할 수 있다.

- [0040] 상기 VCAM-1 유전자 발현 억제제 또는 VCAM-1 단백질 활성 억제제는 조혈모세포의 골수로부터 말초혈류 및 말초 조직으로의 이동을 조절하고, 동시에 기질세포와 조혈모세포 간의 세포부착능을 조절하는 효과를 가지고 있다. 따라서, 말초 혈류 및 조직에서 면역세포의 증가를 유도하는바 상기 VCAM-1 유전자 발현 억제제 또는 단백질 활성 억제제는 면역세포 감소증 치료에 사용될 수 있다.
- [0041] 상기 면역세포 감소증은 특히 말초 혈류 또는 말초 조직에서 면역세포가 감소하는 상태로서, 면역세포 감소증이 지속되는 경우, 면역결핍증, 암, 바이러스 감염을 유발할 수 있다.
- [0042] 상기 면역세포는 T 림프구, B 림프구, 대식세포, 호산구, 호염구, 단핵구, 중성구, 자연살상세포(Natural killer cell) 및 수지상 세포일 수 있으며, 바람직하게는 T 림프구, B 림프구 또는 대식세포일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0043] 본 발명의 VCAM-1 유전자의 발현 억제제 또는 VCAM-1 단백질의 활성 억제제는 면역결핍증, 암 또는 바이러스 감염 치료제와 병용투여하여 사용할 수 있으며, 병용투여 가능한 치료제는 이에 제한되지 않는다.
- [0044] 본 발명의 VCAM-1 유전자의 발현 억제제 또는 VCAM-1 단백질의 활성 억제제는 면역결핍증 치료, 암 치료 또는 바이러스 감염 치료 보조제로도 사용될 수 있다. 상기 '면역결핍증 치료, 암 치료 또는 바이러스 감염 치료 보조제'란 당업계에서 일반적으로 사용되는 면역 결핍증 치료제, 암 치료제 또는 바이러스 감염 치료제의 효과를 증진시키기 위하여 보조적으로 사용될 수 있는 제제를 말하며, 본 발명에 의한 보조제를 사용함으로써 말초 혈류 또는 말초 조직에서 면역세포의 생성을 촉진하여 치료제의 효과를 증진시킬 수 있으므로, 면역 결핍증 치료제, 암 치료제 또는 바이러스 감염 치료제와 함께 보조제로 유용하게 이용할 수 있다.
- [0045] 본 발명의 조성물은 VCAM-1 유전자 발현 억제제 또는 VCAM-1 단백질 활성 억제제와 함께 면역세포 감소증에 대하여 치료 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.
- [0046] 본 발명의 조성물은 약학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약제적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이드알실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엷, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약제적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 내지 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0047] 본 발명의 조성물은 실제 임상투여시에 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제할 수 있으며, 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제는 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, 최근, Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 것을 이용하는 것이 바람직하다. 상기 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 광물유 등이 있다.
- [0048] 상기 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스 (Sucrose) 또는 락토오스(Lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테레이트 탈크 같은 윤활제 들도 사용된다. 또한, 상기 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0049] 상기 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로스테라틴 등이 사용될 수 있다. 상기 비경구투여는 피부 외용 또는 복강 내 주사, 직장 내 주사, 피하주사, 정맥주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사 주입방식을 사용하여 이루어질 수 있다.

- [0050] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하며, 하루에 한 번 투여할 수도 있고, 수 회 나누어 투여할 수도 있다.
- [0051] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0052] 본 발명의 약학적 조성물은 면역세포 감소증의 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0053] 본 발명에서 용어 '치료'는 본 발명의 약학적 조성물에 의해 면역세포 감소증에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0055] 이하 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 이에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [0057] **실시예 1. 면역기관별 phc2 유전자 적중생쥐에서 면역세포 수 측정**
- [0058] phc2 유전자 적중생쥐의 면역세포 수 측정을 통한 표현형 분석을 위하여 phc2 유전자 적중 생쥐의 면역 기관을 분석하였으며, 이를 위해 유세포분석기를 사용하였다. 보다 구체적으로, B6 백그라운드의 8주령의 정상 생쥐와 8주령의 phc2 유전자 적중 생쥐(Isono, Kyo-ichi, et al. "Mammalian polyhomeotic homologues Phc2 and Phc1 act in synergy to mediate polycomb repression of Hox genes." (Molecular and Cellular Biology 25.15 (2005): 6694-6706)과 동일한 방식으로 적중시킨 phc2 유전자 적중 생쥐)의 면역기관을 분석하여 면역세포의 수를 측정하였으며, 그 결과는 도 1에 나타내었다.
- [0059] 도 1에 나타낸 바와 같이, 정상 생쥐(WT)와 phc2 유전자 적중 생쥐(KO)간에 골수(BM)에서의 면역세포의 수는 비슷하게 나타난 반면, 흉선(Thy), 비장(SP), 간(Liver)에서의 면역세포의 수는 정상 생쥐(WT)의 경우에 비해 phc2 유전자 적중 생쥐(KO)에서 현저히 감소되어 있음을 확인하였다. 이는 phc2 유전자 적중 생쥐의 골수 외 조직에서 면역 결핍 현상이 발생함을 나타낸다.
- [0061] **실시예 2. 면역기관별 phc2 유전자 적중생쥐에서 면역세포 비율 측정**
- [0062] phc2 유전자 적중생쥐의 면역세포 비율 측정을 통한 표현형 분석을 위하여 상기 실시예 1에서 phc2 유전자 적중 생쥐의 면역 기관을 분석한 결과를 토대로 유세포분석기를 이용하여 면역세포의 비율 분석을 수행하였으며, 그 결과는 도 2에 나타내었다.
- [0063] 도 2에 나타낸 바와 같이, 정상 생쥐(WT) 및 phc2 유전자 KO 생쥐에서 T 림프구(TCR β +), B 림프구(B220+), 대식세포(CD11b+)의 비율에 유의적인 차이가 없음을 확인하였다. 이는 유전자 적중 생쥐에서 발생한 면역 결핍 현상은 면역세포의 집단(subpopulation)의 차이에 기인한 것이 아니며, 즉 골수 내 조혈모세포의 증식의 문제가 아님을 나타낸다.
- [0065] **실시예 3. 균총 형성 단위 분석(Colony forming unit assay; CFU 분석)을 통한 phc2 유전자 적중생쥐의 조혈모세포의 세포분열 측정**
- [0066] phc2 유전자 적중 생쥐의 조혈모세포의 표현형을 분석하기 위하여 균총 형성 단위 분석(Colony forming unit assay; CFU 분석)을 수행하였다. 기존에 공지된 방법으로 정상 생쥐(WT)와 phc2 유전자 적중 생쥐(KO) 간에 골수의 조혈모세포의 분열 정도 및 비장 및 PBMCs(Peripheral blood mononuclear cells)의 분열 정도를 비교하였으며, 그 결과를 도 3에 나타내었다.
- [0067] 도 3에 나타낸 바와 같이, 정상 생쥐와 phc2 유전자 KO 생쥐 유래 골수의 조혈모세포의 분열 정도는 큰 차이를 나타내지 않은 반면, 비장 및 PBMCs는 정상 생쥐에 비해 phc2 유전자 KO 생쥐 유래 세포에서 절반 수준의 CFU를 나타냄을 확인하였다. 이는 phc2 유전자 KO 생쥐에서 조혈모세포의 분화가 골수에서는 정상적으로 일어나나 분

화된 조혈모세포가 비장 및 PBMCs으로 충분히 도달하지 못함을 나타내며, 즉 상기 phc2 유전자 KO 생쥐에서 나타나는 면역 결핍 현상은 골수 내 조혈모세포의 분화 및 증식이 아닌 조혈모세포의 이동 저해에 의한 것임을 나타낸다.

실시예 4. CD45.1 유사유전자형 생쥐(congenic mouse)를 이용한 골수이식에 의한 면역세포의 세포분열 측정

(4-1) 정상 생쥐(WT) 및 phc2 유전자 KO 생쥐 유래 골수세포를 B6 백그라운드 생쥐에 골수이식한 경우

면역세포의 세포분열 정도를 확인을 위하여 B6 백드라운드 생쥐(CD 45.1 congenic 생쥐)를 이용하여 골수이식을 수행하였다. 먼저, B6 백그라운드 생쥐에 7일 이상 동안 항생제(800 mg 설파메톡사졸 + 160 mg 트리메토프림 / 1L)가 들어있는 음용수를 먹인 후, 방사선 조사(900 rad)를 실시하였다. 그 후, CD45.2 양성인 정상 생쥐(WT)와 phc2 유전자 적중 생쥐(KO) 유래 골수세포 1×10^7 개를 수여자 생쥐에 꼬리정맥주사 하여 골수이식을 진행하고, 골수이식 8주 후 수여자 생쥐에서 재구성되는 CD45.2 양성 면역세포의 분포를 골수와 비장에서 각각 분석하였다. 그 결과를 도 4a 및 4b에 나타내었다. 골수, 흉선, 비장에서의 면역세포의 수를 비교한 결과는 도 4a에 나타내고, 비장에서 T 림프구, B 림프구, 대식세포의 수를 비교한 결과는 도 4b에 나타내었다.

도 4a에 나타낸 바와 같이, 공여자의 골수세포가 정상 생쥐(WT) 또는 phc2 유전자 적중 생쥐(KO)로부터 유래 되었는지와 관계없이 수여자인 B6 백그라운드 생쥐의 각 조직에서 면역 세포의 수가 비슷하게 유지되고 있음을 확인할 수 있었다.

또한, 도 4b에 나타낸 바와 같이, 수여자의 비장에서 T 림프구 (TCR β +), B 림프구(B220+), 대식세포(CD11b+)의 상대적인 양 또한 공여자에 관계없이 비슷한 수준으로 나타남을 확인하였다.

(4-2) B6 백그라운드 생쥐 유래 골수세포를 정상 생쥐(WT) 및 phc2 유전자 KO 생쥐에 골수이식한 경우

면역세포의 세포분열 정도를 확인하기 위하여 B6 백드라운드 생쥐를 이용하여 골수이식을 수행하였다. 상기 실시예 (4-1)과 반대로, B6 백그라운드 생쥐 유래 골수세포 1×10^7 개를 정상 생쥐(WT)와 phc2 유전자 적중 생쥐(KO)에 꼬리정맥주사 하여 골수이식을 수행하였고, CD45.2 양성 면역세포의 분포를 골수와 비장에서 각각 분석하였다. 그 결과를 도 4c 및 4d에 나타내었다. 정상 생쥐(WT)와 phc2 유전자 KO 생쥐에서 골수, 흉선, 비장에서의 면역세포의 수를 비교한 결과는 도 4c에 나타내고, 비장에서 T 림프구, B 림프구, 대식세포의 수를 비교한 결과는 도 4d에 나타내었다.

도 4c에 나타낸 바와 같이, 골수에서는 정상 생쥐(WT)와 phc2 유전자 KO 생쥐 모두 비슷한 면역 세포의 분포를 보인 반면, 흉선과 비장에서는 phc2 유전자 KO 생쥐에서 CD45.2 양성 면역세포의 수가 감소됨을 확인하였다.

또한, 도 4d에 나타낸 바와 같이, 비장에서 T 림프구 (TCR β +), B 림프구(B220+), 대식세포(CD11b+)의 상대적인 양 또한 정상 생쥐(WT)와 비교했을 때, phc2 유전자 KO 생쥐가 수여자인 경우에 더 적은 면역세포가 존재함을 확인하였다.

이는 실시예 1 내지 3에서 확인한 phc2 유전자 KO 생쥐의 표현형 결과와 비슷한 결과로, phc2 유전자 KO 생쥐에서의 면역 결핍 현상은 조혈모세포를 포함한 골수 유래 세포가 아닌, 골수 미세환경을 이루는 세포와 관계가 있음을 나타낸다.

실험예 5. 골수 유래 기질세포(stem cell)와 조혈모세포 간 세포부착실험을 통한 조혈모세포의 체내이동 저해 양상 확인

기질세포와 조혈모세포 간의 세포부착 정도가 조혈모세포를 포함한 골수세포의 말초로의 이동 저해를 야기하는 것인지 여부를 확인하기 위하여 골수 유래 기질세포(stromal cell)와 조혈모세포 간의 세포부착(adhesion) 실험을 수행하였다. 먼저, 정상 생쥐(WT) 및 phc2 유전자 적중 생쥐(KO)의 다리뼈를 갈아서 얻은 세포를 5% FBS(fetal bovine serum)와 5% HS(horse serum)을 첨가한 DMEM 배양액에서 3주간 배양하여 정상 생쥐 골수 및 phc2 유전자 KO 생쥐 골수 유래 기질세포를 얻어내고, 이를 배양하였다. 그 후 24 웰 플레이트에 상기 기질세포를 시딩(seeding)하고, 세포가 완전히 붙으면 CFSE(Carboxyfluorescein N-hydroxysuccinimidyl ester)로 염색

하여 라벨링한 정상 생쥐 및 *phc2* 유전자 KO 생쥐 유래 조혈모세포 5×10^4 개를 각각 기질세포가 있는 웰에 시딩하였다. 시딩 후 3시간 경과 하였을 때 부착되지 않은 세포는 PBS로 세척하여 제거해주고, 제거되지 않은 나머지 세포를 수득하여 CFSE 양성 세포의 비율을 유세포분석기를 통해 분석하였다. 그 결과는 도 5에 그래프로 나타내었다.

[0083] 도 5에 나타난 바와 같이, 조혈모세포의 유래에 관계없이, 정상 생쥐(WT)의 기질세포 보다 *phc2* 유전자 적중 생쥐(KO)의 기질세포에 조혈모세포가 더 많이 부착되는 것을 확인하였다. 이는 *phc2* 유전자 KO 생쥐에서 *Phc2* 유전자의 부재로 인해 정상 생쥐(WT)에 비해 조혈모세포와 기질세포 간의 세포부착이 더 잘 이루어지며, 이로 인해 면역세포가 골수에서 말초로 원활하게 이동하지 못함을 나타낸다.

[0085] 실시예 6. 트랜스웰 이동 분석(Transwell migration assay)을 통한 조혈모세포의 체내이동 저해 양상 확인

[0086] 골수 기질세포에서 화학유인물질(chemoattractant)이 조혈모세포의 이동에 미치는 영향을 확인하기 위하여 트랜스웰 이동 분석을 수행하였다. 먼저, 인서트(insert)에 정상 생쥐(WT)와 *phc2* 유전자 적중 생쥐(KO) 유래 기질세포를 시딩하고 기질세포가 완전히 바닥에 붙으면, 그 위에 0.5% BSA(bovine serum albumin)/RPMI 배양액에 들어있는 정상 생쥐(WT)와 *phc2* 유전자 KO 생쥐 유래 조혈모세포 2×10^5 개를 각각 시딩하였다. 이 후, 트랜스웰의 아랫부분에 화학유인물질인 SDF-1(stromal cell-derived factor; 100 ng/ml)이 들어간 0.5% BSA(bovine serum albumin)/RPMI 배양액을 첨가하였다. 16 시간이 경과한 후, 트랜스웰의 바닥부분으로 이동한 조혈모세포의 수를 시딩했던 세포수로 나누어 산정한 값으로 조혈모세포의 이동 양상을 비교하였다. 그 결과는 도 6에 나타내었다.

[0087] 도 6에 나타난 바와 같이, 조혈모세포의 유래에 관계없이, 정상 생쥐(WT) 유래 기질세포에서보다 *phc2* 유전자 KO 생쥐 유래 기질세포에서 이동하는 세포수가 더 적음을 확인하였다. 이는 실시예 5의 세포부착 실험의 결과(도 5 참고)와 마찬가지로, *phc2* 유전자 적중 생쥐 유래 기질세포와 조혈모세포 간에 세포부착이 더 잘 이루어져 화학유인물질에 따른 세포이동이 저해됨을 나타낸다.

[0089] 실시예 7. 단기 이동 분석(Short term migration assay)을 통한 조혈모세포의 체내이동 저해 양상 확인

[0090] 상기 실시예 5 내지 6에서 확인한 기질세포와 조혈모세포 간의 세포부착 현상 및 화학유인물질(chemoattractant)에 의한 골수 기질세포에서 조혈모세포로의 이동 현상이, 생쥐의 체내에서도 동일하게 일어나는지 여부를 확인하기 위하여, 단기 이동 분석을 수행하였다. 정상 생쥐(WT)와 *phc2* 유전자 적중 생쥐(KO)의 골수세포를 추출한 뒤 CFSE로 염색하여 라벨링한 후 2×10^7 개의 골수 세포에 방사선조사(900 rad)를 실시하였다. 방사선 조사를 실시한 골수 세포를 정상 생쥐(WT)와 *phc2* 유전자 KO 생쥐에 각각 정맥주사하고, 3시간이 경과한 후에 유세포분석법을 통해 마우스의 골수에서 CFSE 양성 세포 수를 비교 측정하였으며, 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0091] 도 7에 나타난 바와 같이, 정맥주사한 골수세포의 유래에 관계없이, 수여자가 *phc2* 유전자 KO 생쥐일 때, 골수(BM)에서 CFSE 양성 세포의 세포수가 수여자가 정상 생쥐일 때에 비해 더 많았다. 또한, 비장(SP) 및 PBMC에서 CFSE 양성 세포의 수를 분석한 결과, *phc2* 유전자 적중 생쥐(KO)가 수여자일 때 CFSE 양성 세포가 더 적음을 확인할 수 있었다. 이는 *Phc2* 유전자 적중 생쥐의 골수에서 조혈모세포는 정상적으로 존재하나, 분화된 조혈모세포의 다른 면역기관으로의 이동이 저해되어 비장 및 PBMC에서 면역세포의 수가 감소되는 현상이 나타남을 나타낸다.

[0093] 실시예 8. 실시간 PCR(real-time PCR)을 통한 골수미세환경 요소의 발현 변화 분석 (VCAM-1 유전자의 발현 변화 분석)

[0094] 조혈모세포와 기질세포 간의 세포 부착 및 조혈모세포의 이동에 영향을 미치는 유전자를 구체적으로 확인하기 위하여, 정상 생쥐(WT) 및 *phc2* 유전자 적중 생쥐(KO) 유래 기질세포에서 mRNA를 분리한 후, SDF-1, Ang1, KitL, cathepsin K, ICAM1, ALCAM, P-selectin, VCAM1 및 GAPDH 유전자에 대하여 실시간 PCR을 수행하였다. 실시간 PCR은 하기 [표 1]에 나타난 프라이머를 이용하여 당업자에게 공지된 방법으로 수행하였으며, 그 결과를 도 8에 나타내었다. 이때, GAPDH의 발현은 내적 대조구로서 측정하였다.

표 1

[0096]

조혈모세포의 이동에 영향을 주는 골수미세환경 요소를 확인하기 위한 프라이머 목록

유전자 명칭	프라이머	서열 (5'-3')
SDF1	정방향	GGTTCTTCGAGAGCCACATC
	역방향	TGGGCTGTTGTGCTTACTTG
Ang1	정방향	GGAAGATGGAAGCCTGGAT
	역방향	CCTTCCCAGTCCATCAGC
KitL	정방향	GCTGCTGGTGCAATATGCT
	역방향	TCCTTGGTTTTGACAAGAGGAT
cathepsin K	정방향	CGAAAAGAGCCTAGCGAACA
	역방향	TGGGTAGCAGCAGAACTTG
ICAM1	정방향	AGCCTCCGACTTTCGAT
	역방향	GAGCTTCAGAGGCAGGAAC
ALCAM	정방향	CTGATTGTGGGAATTGTCGTT
	역방향	TCTTAGGCTTCTGTTTTGTCATTGT
P-selectin	정방향	CCTGGCAAGTGAATGATGA
	역방향	GAGCAGGTATAGCTCCCAA
VCAM1	정방향	TGGTGAAATGGAATCTGAACC
	역방향	GACCCAGATGGTGGTTTCC
gapdh	정방향	ATGGTGAAAGGTCGGTGTGAA
	역방향	GGTCGTTGATGGCAACAATCTC

[0098]

도 8에 나타난 바와 같이, 정상 생쥐(WT)와 phc2 유전자 KO 생쥐 유래 기질 세포에서 유전자 SDF-1, cathepsin K, kitL 및 Ang1의 발현은 유의적인 차이를 보이지 않았으며, 세포부착에 관련된 유전자인 ICAM-1, ALCAM 및 P-selectin의 발현 또한 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 반면, 정상 생쥐 유래 기질세포에서보다 phc2 유전자 KO 생쥐 유래 기질세포에서 세포 부착에 관련된 유전자인 VCAM-1의 발현이 유의적으로 증가함을 확인하였다. 이는 VCAM-1 유전자가 기질세포와 조혈모세포 간의 세포부착 및 골수에서 분화된 조혈모세포의 이동에 영향을 주는 요소임을 나타낸다.

[0100]

실시예 9. VCAM-1 항체 및 웨스턴 블롯을 이용한 골수세포 및 기질세포의 VCAM-1 단백질 발현 변화 분석

[0101]

실시예 8에서 확인한 phc2 유전자 적중생쥐(KO) 유래 기질세포에서의 VCAM-1 유전자의 발현 증가를 기초로, 골수세포 및 기질세포에서 VCAM-1 단백질의 발현 역시 증가하는지 여부를 확인하기 위하여 VCAM-1 항체(BD biosciences사의 카탈로그 넘버 553329)를 이용하여 웨스턴 블롯을 수행하였다. 먼저, 정상 생쥐(WT) 및 phc2 유전자 KO 생쥐 유래 골수세포 및 기질세포에서 단백질을 추출한 후, 상기 단백질에 항 VCAM-1 항체를 처리하고 당업자에게 공지된 방식으로 웨스턴 블롯을 수행하였으며, 그 결과를 도 9에 나타내었다. 이때, 내적 대조구로 항 β -actin 항체를 이용하여 β -actin의 발현량을 측정하였다.

[0102]

도 9에 나타난 것과 같이, phc2 유전자 KO 생쥐 유래 골수세포 및 기질세포에서 VCAM-1 단백질 발현이 WT 유래 골수세포 및 기질세포에 비해 높게 유지되고 있음을 확인하였다. 이는 VCAM-1 유전자 전사 조절을 통해 VCAM-1 단백질의 발현이 조절되며 조혈모세포의 세포부착도 및 말초 세포 또는 말초 조직으로의 이동을 조절할 수 있음을 나타낸다.

[0104]

실시예 10. 항 phc2 항체 및 크로마틴 면역 침강반응(chromatin immunoprecipitation)을 이용한 골수미세환경 요소의 발현 변화 분석

[0105]

Phc2 단백질이 VCMA-1의 유전자 수준의 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 항-Phc2 항체를 이용하여 면역 침강반응을 수행하였다. 먼저, 정상 생쥐(WT) 및 phc2 유전자 적중 생쥐(KO)로부터 추출한 골수세포를 1% 포르

알데하이드로 고정시킨 후, 2.5 M 글리신으로 교차-결합(cross-link)시켰다. 그 후, 용해 버퍼를 이용하여 세포를 파괴시키고, 초음파 분해기(sonicator)를 이용하여 DNA 단편이 300 내지 1000 bp가 되도록 절단하였으며, 절단된 DNA 표본을 항 phc2 항체와 단백질 A/G 아가로스 비드로 진탕기(shaker)에서 12시간 이상 동안 반응시켰다. 반응시킨 DNA를 세척 버퍼로 세척한 후, 용출 버퍼(elution buffer)로 추출하고 이어서, 추출한 DNA에 RNase A를 첨가한 후 PCR 정제 키트로 DNA를 최종 정제하였다. 그 후 최종 정제된 DNA를 하기 [표 2]에 나타낸 VCAM-1 유전자에 특이적인 프라이머를 이용하여 당업자에게 공지된 방식으로 PCR을 수행하였으며, 그 결과를 10에 나타내었다.

표 2

면역 침강반응에 사용된 프라이머 목록

프라이머 명칭	프라이머	서열 (5'-3')
VCAM1 프로모터1	정방향	CATCTAGAAGATGCTGCAGG
	역방향	GGTCTTACACATGCATAGCC
VCAM1 프로모터2	정방향	CCTTCATTCTGCATCAACGTCC
	역방향	GACAGGCAAAGACAGAGATCAC
VCAM1 프로모터3	정방향	TTCGGAGCTGAAGGTCAGGAA
	역방향	AAGTGTTGAGCCTCCAAAGCCA
VCAM1 인트론1	정방향	CACACATCTACAGCTTCTGGTG
	역방향	TGCGCAGCAATACAGTGTCC
VCAM1 인트론3-엑손4	정방향	AACTCCAACCTGGCAGAGCAG
	역방향	TGGAACAGGTCATTGTACAGC
VCAM1 엑손6	정방향	CCACTGTGTCATGGGAGACCTG
	역방향	GCTGTACACTCTGCCTCTGTT
VCAM1 인트론8-엑손9	정방향	ATGAGTATTGCAACCACGAGCTG
	역방향	GCAGGTATTACCAAGGAAGATGC

도 10에서 나타낸 바와 같이, 정상 생쥐 유래 DNA는 VCAM-1 프로모터 부분에 항 Phc2 항체가 붙어서 PCR 밴드가 나타나는 반면, phc2 유전자 KO 생쥐 유래 DNA의 경우에는 7가지 프라이머를 이용하여 수행한 모든 경우에서 어떠한 밴드도 관찰되지 않았다. 한편, 음성대조구(control) 항체에서도 7가지 프라이머를 이용하여 수행한 모든 경우에서 어떠한 밴드도 관찰되지 않았다. 이는 Phc2 단백질이 VCAM-1 유전자의 프로모터에 부착되어 VCAM-1 유전자의 전사를 조절함을 나타낸다.

실시예 11. 세포부착 실험을 통한, 항 VCAM-1 및 항 VLA-4를 이용한 조혈모세포의 체내 이동 개선 확인

말초 면역 세포 감소증이 VCAM-1 유전자의 과발현에 의한 것인지 여부를 확인하기 위하여 VCAM-1 중화항체(20 μ g/ml) 및 VCAM-1 리간드인 VLA-4 중화항체(50 μ g/ml)를 이용한 골수 유래 기질세포와 조혈모세포 간의 세포 부착 실험을 수행하였다. 먼저, 정상 생쥐(WT) 및 phc2 유전자 적중 생쥐(KO)의 다리뼈를 갈아서 얻은 세포를 5% FBS(fetal bovine serum)와 5% HS(horse serum)을 첨가한 DMEM 배양액에서 3주간 배양하여 정상 생쥐 골수 및 phc2 유전자 KO 생쥐 골수 유래 기질세포를 얻어내고, 이를 배양하였다. 그 후 24 웰 플레이트에 상기 기질세포를 시딩(seeding)하고 세포가 완전히 붙으면, VCAM-1 중화항체(BD biosciences사의 카탈로그 넘버 553329) 및 VLA-4 중화항체(Millipore사의 카탈로그 넘버 CBL 1304의 항체)를 처리한 후 CFSE(Carboxyfluorescein N-hydroxysuccinimidyl ester)로 염색하여 라벨링한 정상 생쥐 및 KO 유래 조혈모세포 5 X 10⁴ 개를 각각 기질세포가 있는 웰에 시딩하였다. 시딩 후 3시간 경과 하였을 때 부착되지 않은 세포는 PBS로 세척하여 제거해주고, 제거되지 않은 나머지 세포를 수득하여 CFSE 양성 세포의 비율을 유세포분석기를 통해 분석하였다. 그 결과를 도 11에 나타내었다.

도 11에 나타낸 바와 같이, VCAM-1 중화항체 및 VLA-4 중화항체를 처리하지 않았을 경우에는 정상 생쥐 유래 기질세포에서보다 phc2 유전자 KO 생쥐 유래 기질세포에서 조혈모세포의 세포부착능이 더 높았던 반면, VCAM-1 중화항체와 VLA-4 중화항체를 처리한 경우에는 정상 생쥐(WT) 유래 기질세포 및 phc2 유전자 KO 생쥐 유래 기질세포

포 상에서 조혈모세포의 세포부착 능력이 유의적인 차이가 나타나지 않음을 확인하였다. 이는 VCAM-1 중화항체 또는 VLA-4 중화항체가 VCAM-1의 단백질 발현을 억제하므로 phc2 유전자에 의한 조혈모세포와 기질세포의 부착 능력을 억제하는 효과를 가짐을 나타낸다.

[0115] 실시예 12. 트랜스웰 이동 분석(Transwell migration assay)을 통한, VCAM-1 중화항체 및 VLA-4 중화항체의 조혈모세포의 체내 이동 개선 확인

[0116] phc2 유전자 적중 생쥐에서 나타나는 말초 면역 세포 감소증이 VCAM-1 유전자의 과발현에 의한 것인지 여부를 확인하기 위하여 추가적으로 VCAM-1 중화항체 및 VLA-4 중화항체를 이용한 화학유인물질에 따른 트랜스웰 이동 분석을 수행하였다. 먼저, 인서트(insert)에 정상 생쥐(WT)와 phc2 유전자 적중 생쥐(KO) 유래 기질세포를 시딩하고 기질세포가 완전히 바닥에 붙으면, 그 위에 VCAM-1 중화항체(BD biosciences사의 카탈로그 넘버 553329의 항체) 및 VLA-4 중화항체(Millipore사의 카탈로그 넘버 CBL 1304의 항체)를 처리한 0.5% BSA(bovine serum albumin)/RPMI 배양액에 들어있는 정상 생쥐(WT)와 phc2 유전자 KO 생쥐 유래 조혈모세포 2×10^5 개를 각각 시딩하였다. 이 후, 트랜스웰의 아랫부분에 화학유인물질인 SDF-1(stromal cell-derived factor; 100 ng/ml)이 들어간 0.5% BSA(bovine serum albumin)/RPMI 배양액을 첨가하였다. 16 시간이 경과한 후, 트랜스웰의 바닥부분으로 이동한 조혈모세포의 수를 시딩했던 세포수로 나누어 산정한 값으로 조혈모세포의 이동 양상을 비교하였다. 그 결과를 도 12에 나타내었다.

[0117] 도 12에 나타낸 바와 같이, VCAM-1 중화항체와 VLA-4 중화항체를 처리하지 않았을 경우에는 phc2 유전자 KO 생쥐 유래 기질세포에서 정상 생쥐(WT) 유래 기질세포에서보다 조혈모세포의 이동이 더 저해됨을 확인하였다. 반면, VCAM-1 중화항체와 VLA-4 중화항체를 처리한 경우에는 정상 생쥐(WT) 유래 기질세포 및 phc2 유전자 KO 생쥐 유래 기질세포 상에서 조혈모세포의 이동에 유의적인 차이가 나타나지 않음을 확인하였다. 이는 VCAM-1 중화항체 또는 VLA-4 중화항체가 VCAM-1의 단백질 발현을 억제하며, 조혈모세포의 골수에서 말초 혈류 및 말초 조직으로의 이동 능력을 개선시킴을 나타낸다.

[0119] 실시예 13. 단기 이동 분석(Short term migration assay)을 통한, VCAM-1 중화항체 및 VLA-4 중화항체의 조혈모세포의 체내 이동 개선 확인

[0120] 실시예 11 내지 12에서 확인한 VCAM-1 중화항체 및 VLA-4 중화항체가 기질세포와 조혈모세포 간의 세포부착 현상 및 화학유인물질에 의한 골수 기질세포에서 말단 조직 또는 말단 세포로의 이동 현상에 미치는 영향이 생쥐의 체내에서도 동일하게 일어나는지 확인하기 위하여 단기 이동 분석을 수행하였다. 먼저, 정상 생쥐(WT)와 phc2 유전자 적중 생쥐(KO)의 골수세포를 추출한 뒤 CFSE로 염색하여 라벨링한 후 2×10^7 개의 상기 골수 세포에 방사선조사(900 rad)를 실시하였다. 방사선 조사를 실시한 골수 세포를 VCAM-1 중화항체(BD biosciences사의 카탈로그 넘버 553329의 항체) 및 VLA-4 중화항체(Millipore사의 카탈로그 넘버 CBL 1304의 항체)를 처리한 정상 생쥐와 phc2 유전자 KO 생쥐에 각각 정맥주사하고, 3시간이 경과한 후에 유세포분석법을 통해 각 마우스의 골수에서 CFSE 양성 세포 수를 비교 측정하였다. 그 결과는 도 13에 나타내었다.

[0121] 도 13에 나타낸 것과 같이, 항체를 처리하지 않은 군의 경우, 수여자가 phc2 유전자 KO 생쥐일 때, 골수에 CFSE 양성 면역세포의 수가 정상 생쥐(WT)일 때보다 더 많았고, phc2 유전자 KO 생쥐의 비장 및 PBMC에서 CFSE 양성 면역세포의 수가 더 적음을 확인하였다. 반면, VCAM-1 중화항체와 VLA-4 중화항체를 처리한 경우에는 정상 생쥐와 phc2 유전자 KO 생쥐의 골수에서 CFSE 양성 면역세포가 비슷한 수준으로 감소하였고, 비장 및 PBMC에서는 유의적인 차이 없이 모두 증가함을 확인하였다. 이는 VCAM-1 중화항체 또는 VLA-4 중화항체가 VCAM-1의 단백질 발현을 억제하며 조혈모세포와 기질세포의 부착을 억제하고 조혈모세포의 이동을 개선시키는 효과를 가지는 바, 조혈모세포의 이동 및 세포 부착능을 조절하는 조성물로서 활용될 수 있음을 나타낸다.

[0122] 또한, 조혈모세포의 이동 및 세포 부착능의 조절 능력을 가지는 VCAM-1 유전자 발현 억제제 또는 VCAM-1 단백질 활성 억제제는 조혈모세포의 이동 조절을 통해 말초 혈류 및 말초 조직에서 면역 세포의 감소를 억제하는바, 면역세포 감소증의 치료제로 이용될 수 있으며, 더 나아가 백혈병, 다발성경화증, 림프종 등 혈액 유래 질환의 치료방법으로 사용되는 조혈모세포이식에서 용이한 공여자의 조혈모세포 확보를 위해 이용될 수 있다.

[0124] 이하 본 발명의 VCAM-1 유전자 발현 억제제 또는 VCAM-1 단백질의 활성 억제제를 포함하는 면역세포 감소증 치료용 약학적 조성물의 제제예를 설명하나, 이는 본 발명을 한정하고자 함이 아니고 단지 이를 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0126] 제제예 1. 약학적 제제의 제조

[0127] 1. 산제의 제조

[0128] VCAM-1 유전자 발현 억제제 또는 VCAM-1 단백질의 활성 억제제 20 mg

[0129] 유당 100 mg

[0130] 탈크 10 mg

[0131] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.

[0133] 2. 정제의 제조

[0134] VCAM-1 유전자 발현 억제제 또는 VCAM-1 단백질의 활성 억제제 10 mg

[0135] 옥수수전분 100 mg

[0136] 유당 100 mg

[0137] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0138] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

[0140] 3. 캡슐제의 제조

[0141] VCAM-1 유전자 발현 억제제 또는 VCAM-1 단백질의 활성 억제제 10 mg

[0142] 결정성 셀룰로오스 3 mg

[0143] 락토오스 14.8 mg

[0144] 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg

[0145] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

[0147] 4. 주사제의 제조

[0148] VCAM-1 유전자 발현 억제제 또는 VCAM-1 단백질의 활성 억제제 10 mg

[0149] 만니톨 180 mg

[0150] 주사용 멸균 증류수 2974 mg

[0151] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 26 mg

[0152] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당 (2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

[0154] 5. 액제의 제조

[0155] VCAM-1 유전자 발현 억제제 또는 VCAM-1 단백질의 활성 억제제 20 mg

[0156] 이성화당 10 g

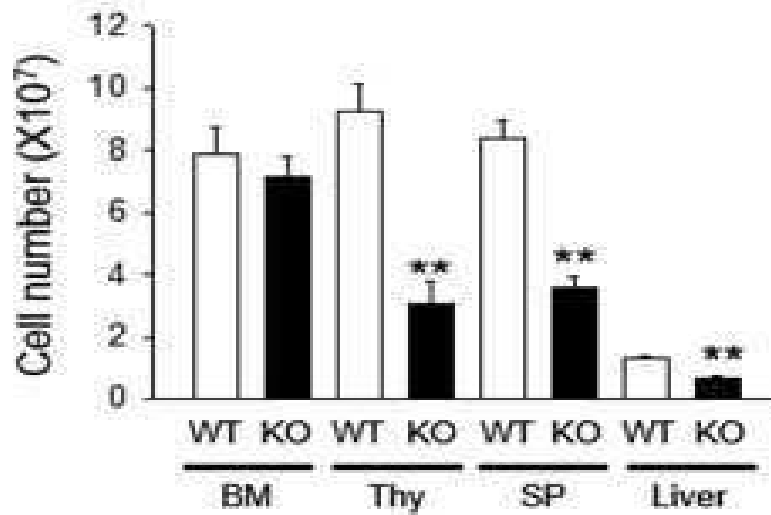
[0157] 만니톨 5 g

[0158] 정제수 적량

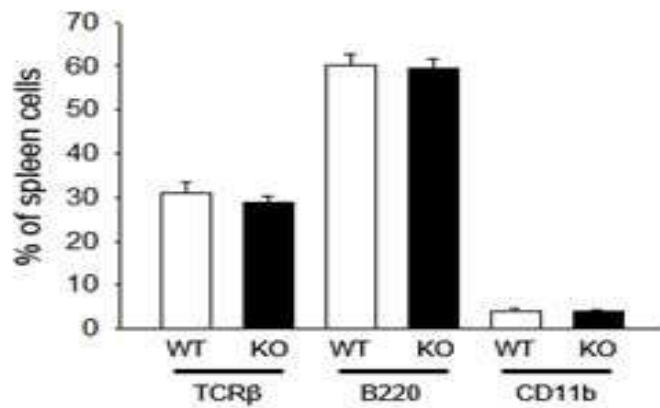
[0159] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

도면

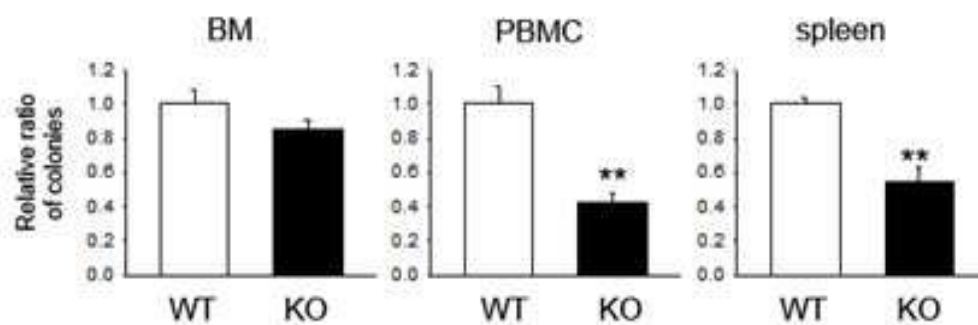
도면1



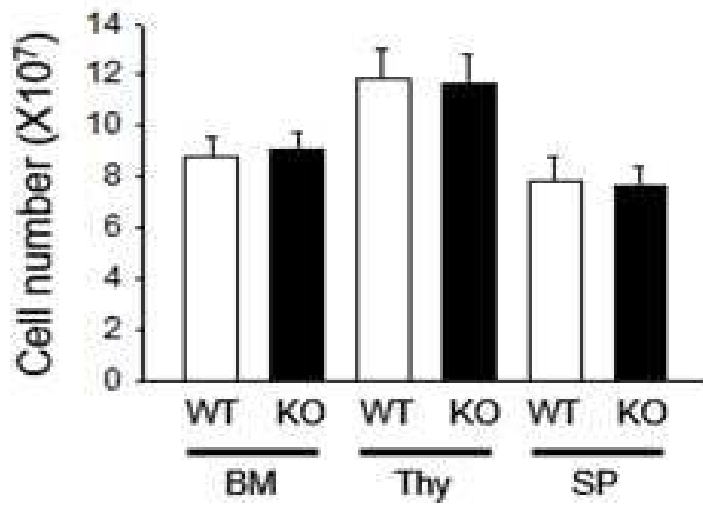
도면2



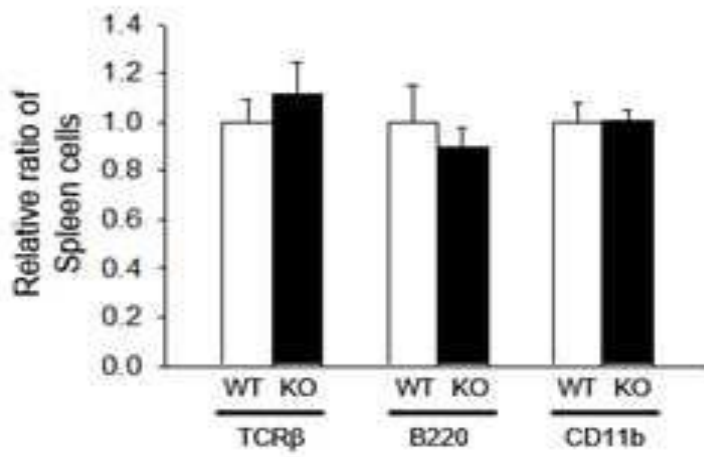
도면3



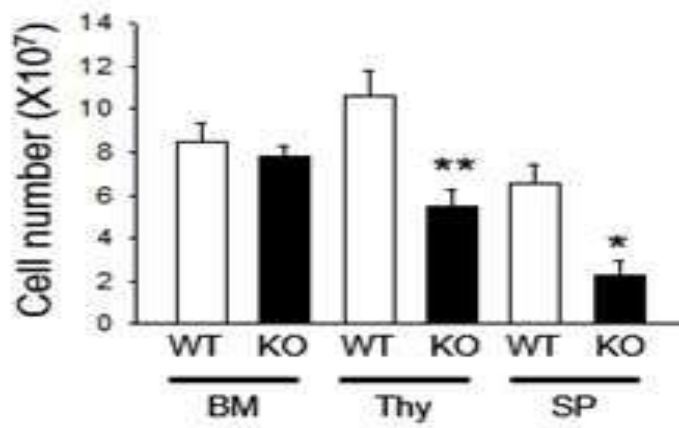
도면4a



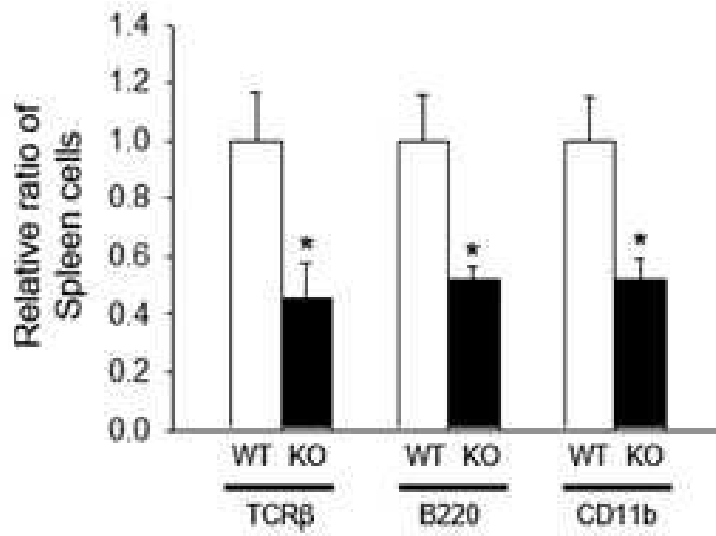
도면4b



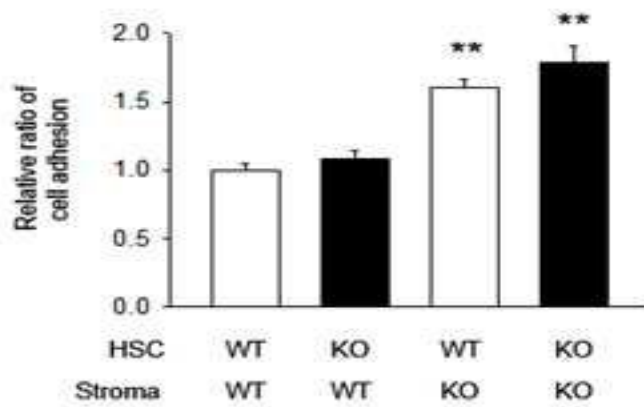
도면4c



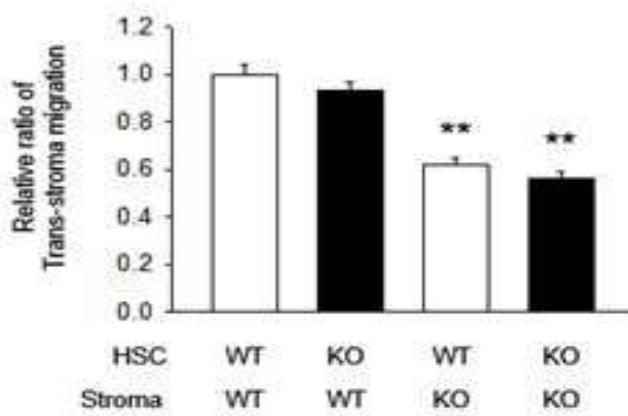
도면4d



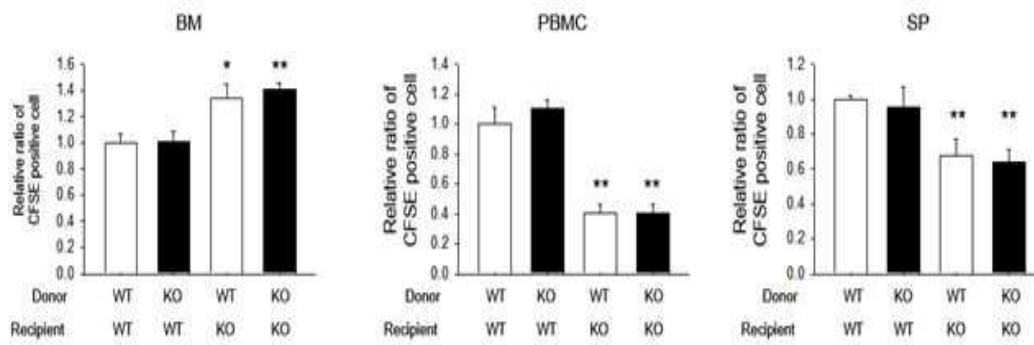
도면5



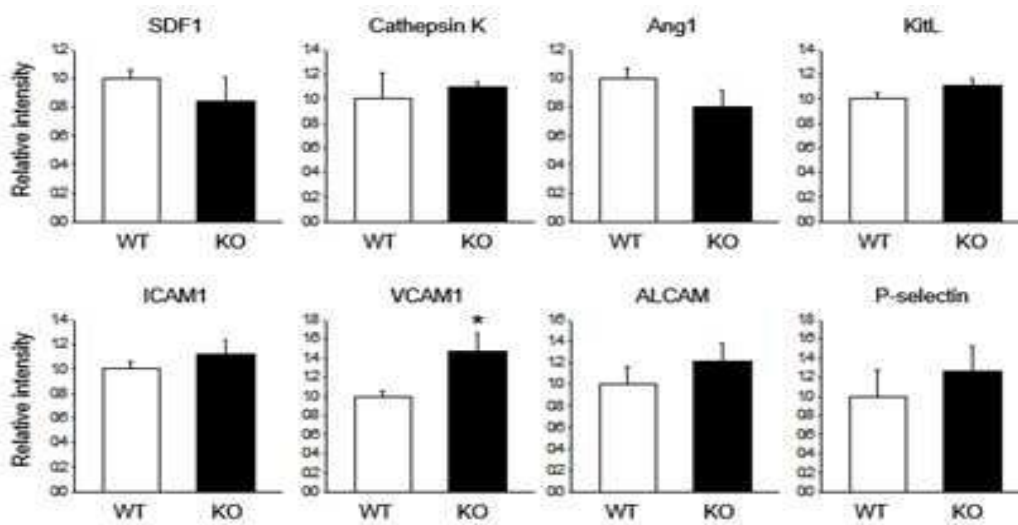
도면6



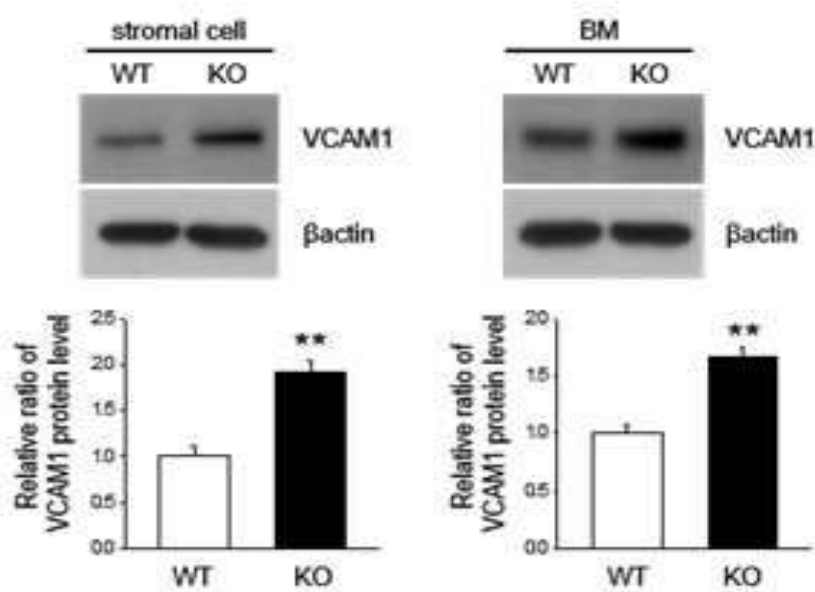
도면7



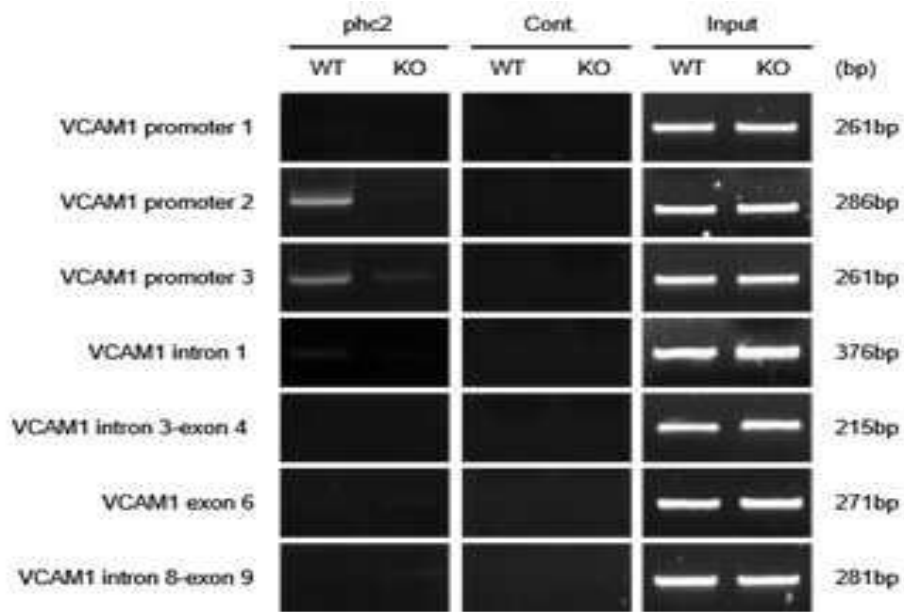
도면8



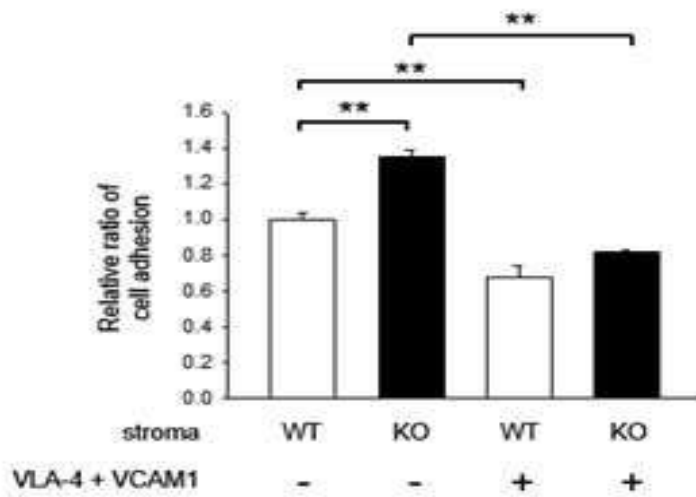
도면9



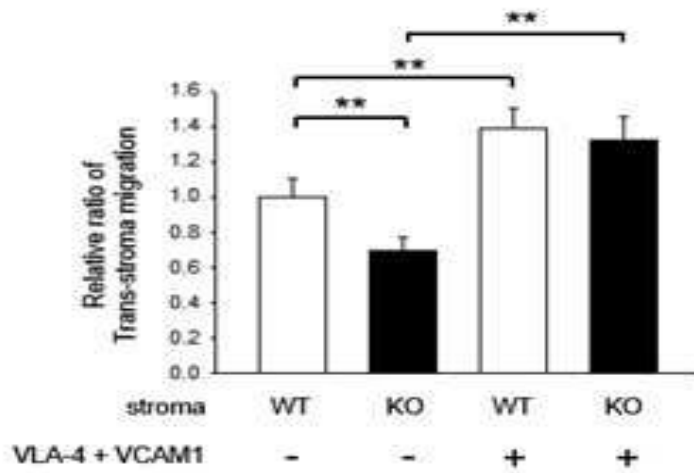
도면10



도면11



도면12



도면13

