



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0060099

(43) 공개일자 2023년05월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/0783 (2010.01)

(52) CPC특허분류

C12N 5/0646 (2023.05)

C12N 2500/02 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0144380

(22) 출원일자 2021년10월27일

심사청구일자 2021년10월27일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

이경미

서울특별시 강남구 압구정로 151, 105동 505호(압구정동, 신현대아파트)

신민화

서울특별시 동대문구 장안벚꽃로 107, 113동 1001호(장안동, 장안현대홈타운)

(74) 대리인

특허법인태백

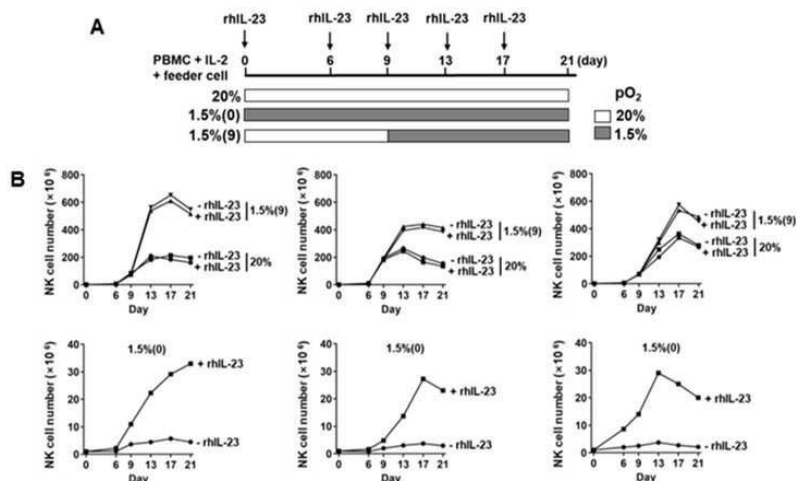
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 IL-23을 이용하여 종양미세환경을 극복할 수 있는 자연살해세포 증식방법

(57) 요약

본 발명은 IL-23을 이용하여 종양미세환경을 극복할 수 있는 자연살해세포 증식방법에 대한 것으로, 저산소 환경을 극복할수 있는 자연살해세포의 개발을 위하여, 자연살해세포의 저산소 조건하 체외 확장 배양시에 IL-23을 처리하는 경우, 자연살해세포의 증식과 암세포 살상능이 현저히 증대된다는 것을 확인하였다. 본 발명에 따른 자연살해세포 확장 배양방법을 사용하면, 저산소 조건에서 자연살해세포의 증식과 암세포 살상능력이 향상되어, 면역회피 현상을 극복할 수 있어 악성 고형암치료에 효율적으로 활용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 2501/2302 (2013.01)

C12N 2501/2323 (2013.01)

C12N 2502/11 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711127950
과제번호 2018M3A9D3079288
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 바이오.의료기술개발(R&D)
연구과제명 Epigenome 조절을 통한 항암면역세포치료제 생산의 고도화
기 여 율 25/100
과제수행기관명 고려대학교
연구기간 2021.01.01 ~ 2021.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345332935
과제번호 2021R111A1A01040390
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명 고형암의 저산소 환경을 극복가능케 하는 자연살해세포 신규 수용체의 역할규명을
통한 새로운 췌장암 치료전략

기 여 율 25/100
과제수행기관명 고려대학교
연구기간 2021.06.01 ~ 2022.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711128074
과제번호 2016M3A9B6948342
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 바이오.의료기술개발(R&D)
연구과제명 안전성장치가 탑재된 난치성 암 항원 타겟 CAR-T 세포치료제 개발
기 여 율 25/100
과제수행기관명 고려대학교
연구기간 2021.01.01 ~ 2021.08.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711121140
과제번호 2020R1A2C2103061
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명 CD244에 의한 건선질환 제어 기전 연구
기 여 율 25/100
과제수행기관명 고려대학교
연구기간 2020.09.01 ~ 2021.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

자연살해세포를 IL-23 및 IL-2를 함유하는 배지에서 배양보조세포(feeder cell)와 함께 배양하는 단계를 포함하는 자연살해세포의 증식 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 배양보조세포는 방사선 조사된 Jurkat 세포 및 방사선 조사된 EBV-LCL 세포인 것을 특징으로 하는 자연살해세포의 증식 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 배양은 저산소 조건에서 배양하는 것을 특징으로 하는 자연살해세포의 증식 방법.

청구항 4

제4항에 있어서, 상기 저산소 조건은 산소 분압이 1% 내지 5% 조건인 것을 특징으로 하는 자연살해세포의 증식 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 배양은 1 내지 21일간 수행하는 것을 특징으로 하는 자연살해세포의 증식 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 IL-23은 자연살해세포의 배양 0일에 첫 번째 처리한 후, 3일, 6일, 9일, 13일, 17일에 추가적으로 처리하는 것을 특징으로 하는 자연살해세포의 증식 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 IL-23은 50 내지 200ng/ml 농도로 함유되는 것을 특징으로 하는 자연살해세포의 증식 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 방법은 자연살해세포의 생존, 증식 및 암세포 살상능을 증대시키는 것을 특징으로 하는 자연살해세포의 증식 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 종양미세환경에서 면역세포의 회피작용을 일으키는 대표적인 저산소 조건에서, 자연살해세포의 생존, 증식, 암세포 살상능을 증진시키는 기술로서, 보다 상세하게는 저산소 조건에서 자연살해세포를 IL-23과 함께 배양하는 단계를 포함하는 자연살해세포 제조방법에 대한 것이다.

배경 기술

[0002]

암은 전 세계적으로 질병 사망의 최고 수위를 차지하는 질병으로 수술, 방사선치료, 항암화학요법 등의 복합적인 치료를 하더라도 50% 이상의 환자는 결국 사망하게 되는 난치의 질환이다. 전이가 있는 대부분의 암은 수술 이외에 방사선과 항암 치료를 병행하게 되며 이러한 치료법들은 정상세포에 미치는 부작용이 크고 암세포의 다중약제에 대한 내성으로 치료율이 극히 낮다. 이러한 기존 암 치료법들의 단점을 극복하기 위하여 면역치료제 개발연구가 활발히 진행되고 있는데, 면역세포치료제는 인체의 세포면역 기능을 강화함으로써 환자의 면역체계가 암세포를 공격하도록 활성화하여 항암치료에 사용된다. 다양한 면역세포들 중 제 4세대 항암 치료제로 대두

되고 있는 자연살해세포는 선천적으로 종양억제능을 지닌 항암면역치료제로서 각종 항암치료에 내성을 보이는 말기 암환자의 치료에 사용되고 있으나 체내 생존기간이 짧고 환자의 면역억제환경에 의한 급격한 불활성화에 의한 효능 억제가 문제점으로 대두되고 있다. 자연살해세포가 면역세포치료제로 사용되기 위해서는 다량의 세포 수가 필요하고, 높은 항암능과 효과적인 체내 생존율을 유지해야만 세포치료제로서 제대로 효력을 발휘할 수 있다. 자연살해세포는 선천적으로 암세포의 발생, 증식, 전이 뿐만 아니라 암의 재발에 가장 중요한 암 줄기세포를 효과적으로 억제할 수 있는 종양 억제능 때문에 항암 면역치료제로서 다른 면역세포에 비해 많은 장점을 가진다. 더욱이 자연살해세포를 환자에 동종 이식했을 때 다른 면역세포와 달리 면역거부 반응이 극히 적어서 안전한 면역세포치료제로서의 이용이 가능하다.

[0003]

난치성 고형암 환자의 경우 종양 조직에서 발생하는 면역회피 기전으로 인해 면역세포가 암세포 공격기능저하를 일으키게 된다. 이러한 면역회피 기전의 주요 원인 중 하나는 종양의 내부의 저산소 환경이고, 저산소 환경으로 인한 면역세포의 기능저하로 인해 난치성 고형암은 여전히 치료 장벽이 높다. 일반적으로 우리의 체내는 조직에 따라 3% (말초조직)에서 14% (폐)의 산소 분압을 나타내며 이보다 낮은 산소농도 상태를 저산소 상태로 칭하며 흔히 0.5%에서 3%를 가리킨다. 저산소 조건에서 종양세포는 성장 유지 및 축진이 된다고 보고되고 있으며 이와 반대로 정상세포와 면역세포는 저산소 상태에서 잘 성장하지 못하는 것으로 알려져 있다. 뿐만 아니라 저산소 조건에 의해 면역세포의 기능이 억제된다고 알려져 있다. 이러한 난치성 고형암의 종양조직내부 면역회피 기전 극복을 위해 자연살해세포를 항암 면역세포치료제로 사용하기 위해서는, 항암능이 증대된 다량의 자연살해세포의 생산 및 생체 내에서 자연살해세포가 오랜 기간 생존하여 항암 효력을 발휘할 수 있는 환경의 조성이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004]

(특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1968184호 (2019.04.05 등록)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005]

이에, 본 발명은 종양미세환경에서 면역세포의 회피작용을 일으키는 대표적인 저산소 조건에서, 자연살해세포의 생존, 증식, 암세포 살상능을 증진시키는 기술로서, 보다 상세하게는 저산소 조건에서 자연살해세포를 IL-23과 함께 배양하는 단계를 포함하는 자연살해세포 증진 방법을 제공하는 데에 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0006]

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 자연살해세포를 IL-23 및 IL-2를 함유하는 배지에서 배양보조세포(feeder cell)와 함께 배양하는 단계를 포함하는 자연살해세포의 증식 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0007]

본 발명은 IL-23을 이용하여 종양미세환경을 극복할 수 있는 자연살해세포 증식방법에 대한 것으로, 저산소 환경을 극복할수 있는 자연살해세포의 개발을 위하여, 자연살해세포의 저산소 조건하 체외 확장 배양시에 IL-23을 처리하는 경우, 자연살해세포의 증식과 암세포 살상능이 현저히 증대된다는 것을 확인하였다. 본 발명에 따른 자연살해세포 확장 배양방법을 사용하면, 저산소 조건에서 자연살해세포의 증식과 암세포 살상능력이 향상되어, 면역회피 현상을 극복할 수 있어 악성 고형암치료에 효율적으로 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0008]

도 1은 자연살해세포의 성장에 IL-23이 미치는 영향을 확인한 결과를 나타낸 것으로, A는 말초혈액 단핵구를 정상산소 조건 (20%), 저산소 조건 (1.5%), 정상산소 조건 (20%) 에서 9일간 배양한 후 저산소 조건 (1.5%) 으로 옮겨 추가 배양하면서 IL-23 처리 방법을 나타낸 것이며, B는 IL-23처리 후, 자연살해세포의 성장곡선을 나타낸 것이다.

도 2의 A와 B는 IL-23 처리 유무에 따라 저산소 조건에서 배양한 자연살해세포의 CD107a (살상능 척도)의 발현,

IFN- γ (사이토카인)의 분비를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0009] 이에, 본 발명은 자연살해세포가 배양조기부터 저산소 조건 (1.5% O₂) 에서 배양시 증식과 항암능이 떨어지지만 일단 정상산소조건 (20% O₂) 에서 증식을 활발하게 시작한 세포들을 저산소 (1.5% O₂) 에 넣고 배양하였을 때 증식이 월등히 증대된다는 선행발명에 착안하여 고안한 것이다(대한민국 특허, 등록번호 제10-1968184 참조). 선행발명에서 도출된 결과를 바탕으로, 자연살해세포가 종양조직 내부의 저산소 환경을 극복가능케하는 인자를 발굴하기 위하여, 자연살해 세포가 증식하지 않는 저산소 조건 (1.5% O₂) 에서 배양한 군과 저산소 환경을 극복 가능한 조건 (20% O₂ → 1.5% O₂)에서 배양한 군의 비교 RNA-Seq을 수행하였고, 이를 통해 저산소 조건에서 증식이 월등히 증대되는 자연살해세포에서 특이적으로 발현되는 IL-23을 도출하였다. IL-12 family cytokine에 속하는 IL-23은 활성화된 dendritic cells, macrophages, monocytes, innate lymphoid cells, gamma delta T cells 에서 분비되며, 건선과 같은 자가면역, 염증성질환의 치료 타겟으로 알려져 있고, Th17의 유지 및 확장에 중요한 역할을 한다 (Teng MWL et al., 2015, *Nature Medicine*).
- [0010] 이러한 선행연구결과들을 바탕으로 본 발명자들은 저산소 환경을 극복할 수 있는 자연살해세포의 개발을 위하여, 자연살해세포의 저산소 조건하 체외 확장 배양시에 IL-23을 처리하는 경우, 자연살해세포의 증식과 암세포 살상능이 현저히 증대된다는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0011] 즉, 본 발명에서는 자연살해세포를 저산소 조건에서 확장배양하는 경우에, IL-23을 이용하여 자연살해세포의 수득율을 높이는 방법을 개발하였으며, 저산소 조건에서 배양 0일부터 자연살해세포에 IL-23을 처리하면 처리하지 않은 대조군에 비해 자연살해세포의 확장이 증대된다는 사실을 발견하였다. 뿐만 아니라 저산소 조건에서 IL-23을 처리하여 배양한 자연살해세포가 처리하지 않은 대조군에 비해 암세포 살상능이 증대된다는 사실을 확인하였다. 이와 더불어, 정상산소 조건에서 배양 0일부터 자연살해세포에 IL-23을 처리하면 처리하지 않은 대조군과 비교하여 자연살해세포의 확장과 암세포 살상능의 변화가 없다는 사실을 확인하였다. 또한 정상산소 조건에서 배양 0일부터 IL-23을 처리 배양후, 9일째에 저산소 조건으로 옮겨 배양하면서 IL-23을 처리하면 처리하지 않은 대조군과 비교하여 자연살해세포의 확장과 암세포 살상능의 변화가 없다는 사실을 확인하였다.
- [0012] 본 발명은 자연살해세포를 IL-23 및 IL-2를 함유하는 배지에서 배양보조세포(feeder cell)와 함께 배양하는 단계를 포함하는 자연살해세포의 증식 방법을 제공한다.
- [0013] 바람직하게는, 상기 배양보조세포는 방사선 조사된 Jurkat 세포 및 방사선 조사된 EBV-LCL 세포일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0014] 바람직하게는, 상기 배양은 저산소 조건에서 배양하는 것일 수 있으며, 보다 바람직하게는, 상기 저산소 조건은 산소 분압이 1% 내지 5% 조건일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0015] 바람직하게는, 상기 배양은 1 내지 21일간 수행할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0016] 바람직하게는, 상기 IL-23은 자연살해세포의 배양 0일에 첫 번째 처리한 후, 3일, 6일, 9일, 13일, 17일에 추가적으로 처리할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0017] 바람직하게는, 상기 IL-23은 50 내지 200ng/ml 농도로 함유될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0018] 바람직하게는, 상기 방법은 자연살해세포의 생존, 증식 및 암세포 살상능을 증대킬 수 있다.
- [0019] 본 발명에서는 사람 유래 말초혈액 단핵세포를 분리하여 저산소 조건에서 Jurkat 세포와 EBV-LCL 세포로 공배양 0일부터 IL-23을 처리하였을 때, 기존 배양 방법에 비해 자연살해세포의 세포수가 증가되었으며, 자연살해세포의 CD107a (살상능 척도)의 발현과 IFN- γ (사이토카인)의 분비가 증가하여 암세포 살상능이 증대되었다.
- [0020] 따라서 본 방법은 기존의 방법에 비해 저산소 조건에서 자연살해세포의 증식을 증대시키고 암세포 살상능이 증가한 자연살해세포의 수를 더 많이 확보 가능한 방법이다.
- [0021] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.
- [0022] <실시예 1> 저산소 조건에서 자연살해세포 배양 시 IL-23 처리에 의한 세포수 증가

- [0023] 사람의 혈액을 채혈한 후, Ficoll (Ficoll-paque™ PLUS, GE healthcare)을 이용하여 2500 rpm에서 30분간 원심분리하고, 연막층(buffy coat)에서 말초혈액 단핵세포를 분리하였다. 그 후 100Gy로 방사선 조사한 Jurkat 세포주(한국세포주은행 KCLB:40152)와 EBV-LCL 세포주(한국세포주은행)를 사용하여 IL-2 500 U/ml 존재 하에 말초혈액단핵세포:Jurkat 세포:EBV-LCL 세포의 비율을 1:0.5:0.5로 하고, hRPMI 배지 (RPMI1640 배지에 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin 첨가)에서 공배양하여 2~3일 마다 한번씩 500 U/ml의 IL-2가 첨가된 hRPMI 배지로 교환해 주면서 배양하였다.
- [0024] IL-23이 자연살해세포에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 정상산소 조건, 저산소 조건, 정상산소 조건에서 9일간 배양후 저산소 조건으로 옮겨 배양한 조건에서 자연살해세포 배양 0일, 3일, 6일, 9일, 13일, 17일째에 사람 유래 재조합 IL-23 (human recombinant IL-23, rhIL-23) (Peprotech, USA)을 100ng/ml 처리하여 배양하고 세포수를 확인하였다(도 1A, 1B). 이 때 21일간 배양을 하며 3~4일에 한번씩 헤마토사이토미터를 이용하여 세포수를 계수하였으며, IL-2가 500 U/ml로 첨가된 hRPMI 배지로 교환해 주면서 배양하였다.
- [0025] 도 1B에 나타난 바와 같이, 저산소 조건에서 공배양 0일부터 IL-23을 100ng/ml를 처리한 실험군이 처리하지 않은 대조군에 비해 자연살해세포수가 증대된다는 사실을 발견하였다. 뿐만 아니라 정상산소 조건에서 공배양 0일부터 IL-23을 처리하면 처리하지 않은 대조군과 비교하여 자연살해세포의 확장에 변화가 없다는 사실을 확인하였다. 또한 정상산소 조건에서 공배양 0일부터 IL-23을 처리 배양후, 9일째에 저산소 조건으로 옮겨 배양하면서 IL-23을 처리하면 처리하지 않은 대조군과 비교하여 자연살해세포의 확장에 변화가 없다는 사실을 확인하였다.
- [0026] <실시예 2> 저산소 조건에서 자연살해세포 배양 시 IL-23 처리에 의한 암세포 살상능 변화 확인
- [0027] 실시예 1의 방법으로 체외 확장된 자연살해세포의 암세포 살상능의 변화를 확인하기 위하여, 타겟 암세포로 만성 골수성 백혈병(chronic myelogenous leukemia) 세포주인 K562세포 (ATCC® CCL-243™)를 준비한 후 자연살해세포와 1:1 비율로 섞어 FITC labeled anti CD107a mAb를 2.5 μ l 넣고 Golgi stop (BD pharmingen)을 넣은 후 5시간 동안 37℃에서 배양하였다. 배양이 끝난 후 Percp-labeled CD3mAb (Biolgend Cat No.344814 clone SK7), APC-labeled CD56mAb (Biolegend Cat No.362504 clone 5.1H11)를 넣고 4℃에서 20분간 반응하였다. Intracellular FACS를 위해 세포를 FACS buffer로 세척하고 고정시킨 후 BD cytoperm/cytofix kit (BD Pharmingen, San Diego, CA)로 투과시켜 PE-labeled IFN- γ mAb로 염색한 후 유세포 분석기를 이용하여 분석하였다.
- [0028] 그 결과, 도 2의 (A), (B)에서 나타난 바와 같이, 저산소 조건에서 배양 0일부터 IL-23을 처리한 자연살해세포군은 처리하지 않은 대조군에 비해 CD107a (살상능 척도)의 발현과 IFN- γ (사이토카인)의 분비가 증대되어 암세포 살상능이 증대되었다는 것을 알 수 있었다. 뿐만 아니라 정상산소 조건에서 배양 0일부터 자연살해세포에 IL-23을 처리하면 처리하지 않은 대조군과 비교하여 CD107a (살상능 척도)의 발현과 IFN- γ (사이토카인)의 분비의 변화가 없다는 사실을 확인하였다. 또한, 정상산소 조건에서 배양 0일부터 IL-23을 처리 배양 후, 9일째에 저산소 조건으로 옮겨 배양하면서 IL-23을 처리하면 처리하지 않은 대조군과 비교하여 CD107a (살상능 척도)의 발현과 IFN- γ (사이토카인)의 분비의 변화가 없다는 사실을 확인하였다.
- [0029] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 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.

