



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0105590
(43) 공개일자 2022년07월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0775 (2010.01) A61K 35/28 (2015.01)
A61K 38/00 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01) A61P 37/06 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0665 (2013.01)
A61K 35/28 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0001265
(22) 출원일자 2022년01월05일
심사청구일자 2022년01월05일
(30) 우선권주장
1020210008386 2021년01월20일 대한민국(KR)

(71) 출원인
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
김현식
서울특별시 광진구 광나루로56길 32, 201동 501호(구의동, 구의현대2단지아파트)
김승후
서울특별시 송파구 오금로31길 28, 103동 1312호(방이동, 코오롱아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이명진

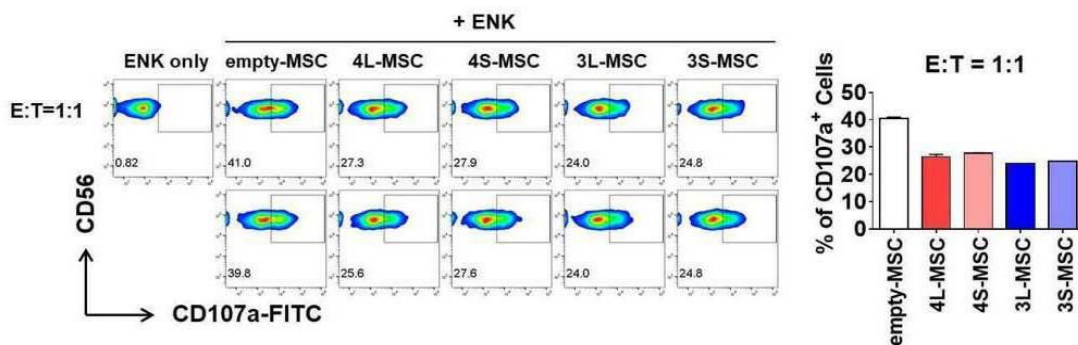
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 면역세포 관용성 조절인자 과발현 줄기세포 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 만성 난치성 질환 치료를 위한 면역세포 관용성 조절인자 과발현 줄기세포에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 CEACAM (Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule) 패밀리 단백질을 과발현하도록 유전적으로 조작되어 면역반응 회피능을 획득한 줄기세포, 상기 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물 및 상기 줄기세포의 제조방법 등에 관한 것이다. 본 발명에 따른 줄기세포 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물은 자연살해세포 (NK cell)의 탈과립과 세포살상 능력을 감소시키고, 줄기세포의 생존율을 증가시키는 효과가 있다. 따라서 본 발명에 따른 면역회피 기능이 획득된 CEACAM 단백질 과발현 줄기세포를 이용하면, 생체 내 생존율을 높여 반복 투여에 의한 부작용을 줄임과 동시에 이식편대숙주질환, 천식, 섬유증 등 다양한 염증성 질환, 자가면역질환 등에 효과적인 세포 치료제로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 38/00 (2013.01)
A61K 48/00 (2013.01)
A61P 25/28 (2018.01)
A61P 37/06 (2018.01)
C07K 14/47 (2013.01)
C12N 2740/15043 (2013.01)

(72) 발명자

이은비

서울특별시 강동구 올림픽로62길 23-16, 큰나무집
 401호

김효정

서울특별시 송파구 강동대로7길 21, 303호(카멜리아빌)

김정민

경기도 안성시 공도읍 공도로 150, 111동 702호(케이씨씨스위첸)

최우선

경기도 하남시 미사강변북로 65, 1005동 101호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711111009
과제번호	2018R1A5A2020732
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	기초의과학분야(MRC)
연구과제명	줄기세포 면역제어 연구센터
기 여 율	1/1
과제수행기관명	울산대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

CEACAM (Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule) 패밀리 단백질을 과발현하도록 유전적으로 조작되어 면역반응 회피능을 획득한 줄기세포.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 CEACAM 패밀리 단백질은 CEACAM1, CEACAM3, CEACAM5, 및 CEACAM6으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 줄기세포.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 CEACAM 패밀리 단백질은 CEACAM1인 것을 특징으로 하는, 줄기세포.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 CEACAM1은 CEACAM1-3L, CEACAM1-3S, CEACAM1-4L 및 CEACAM1-4S로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 줄기세포.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 줄기세포는 중간엽줄기세포 (Mesenchymal stem cells)인 것을 특징으로 하는, 줄기세포.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 중간엽줄기세포는 골수 유래 중간엽줄기세포 (Bone marrow-derived mesenchymal stem cells), 지방 유래 중간엽줄기세포 (Adipose-derived mesenchymal stem cells), 제대 유래 중간엽줄기세포 (Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells), 제대혈 유래 중간엽줄기세포 (Umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells), 배아줄기세포 유래 중간엽줄기세포 (Embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells), 및 유도만능줄기세포 유래 중간엽줄기세포 (induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 줄기세포.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 줄기세포는 면역관문 단백질을 추가로 과발현하는 것을 특징으로 하는, 줄기세포.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 면역관문 단백질은 PD-1, PD-L1, PD-L2, CD47, CD39, CD73, CD200, HVEM, CD155, TIM3, LAG-3, CTLA-4, A2AR, B7-H3, B7-H4, HLA-E, BTLA, IDO, KIR, 및 VISTA로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 줄기세포.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 줄기세포는 NK 세포 (natural killer cell)에 의한 면역반응을 회피할 수 있는 것을 특징으로 하는, 줄기세포.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 NK 세포에 의한 면역반응 회피는 NK 세포의 탈과립 활성 감소에 의한 것을 특징으로 하는, 줄기세포.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 줄기세포는 T 세포의 증식을 억제하는 것을 특징으로 하는, 줄기세포.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 줄기세포는 생체 내 생존율이 향상된 것을 특징으로 하는, 줄기세포.

청구항 13

CEACAM (Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule) 패밀리 단백질을 과발현하도록 유전적으로 조작된 줄기세포, 상기 줄기세포로부터 분화된 세포, 및 상기 줄기세포로부터 유래한 성분으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하는, 세포 손상 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 세포 손상 관련 질환은 염증성 질환, 자가면역질환, 신경퇴행성 질환, 및 이식편대숙주질환으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 염증성 질환은 아토피피부염, 전신 홍반성 루프스, 루프스, 동창성 루프스, 결핵성 루프스, 루프스 신염, 이영양성 수포성 표피박리증, 건선, 류마티스열, 류마티스 관절염, 허리 통증, 섬유 근육통, 근막 질환, 미분화 척추관절증, 미분화 관절병증, 관절염, 염증성 골용해, 반응성 관절염, 골관절염, 공피증, 골다공증, 바이러스 또는 박테리아 감염에 의한 만성 염증질환, 대장염, 궤양성 대장염, 염증성 장질환, 곰팡이 감염, 화상, 외과적 또는 치과적 수술에 의한 상처, 당뇨병부패양, 타입 1 당뇨병, 타입 2 당뇨병, 궤양성 피부질환, 부비동염, 비염, 결막염, 천식, 피부염, 염증성 콜라겐 혈관 질환, 사구체신염, 뇌염, 염증성 장염, 만성 폐쇄성 폐질환, 폐쇄성 세기관지염 (Bronchiolitis obliterans), 패혈증, 패혈성 쇼크증, 폐섬유증, 아테롬성 동맥경화증, 심근염, 심내막염, 심낭염, 낭성섬유증, 하시모토 갑상선염, 그레이브스병, 나병, 매독, 라임병 (Lyme disease), 보렐리아증 (Borreliosis), 신경성-보렐리아증, 결핵, 사르코이드증 (Sarcoidosis), 황반변성, 포도막염, 파킨슨 대장 증후군, 크론씨병, 쇼그렌 증후군, 만성피로 증후군, 만성피로 면역부전 증후군, 근육통성 뇌척수염, 근위축성 측삭경화증, 파킨슨병, 및 다발성경화증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 16

제14항에 있어서,

상기 자가면역질환은 자가면역성 간염, 류마티스성 관절염, 골관절염, 인슐린 의존성 당뇨병, 궤양성 대장염, 크론병, 다발성 경화증, 자가면역성 심근염, 피부경화증, 중증근육무력증, 다발성 근육염, 피부 근육염, 하시모토병, 자가면역 혈구감소증, 쇼그렌 증후군, 혈관염 증후군, 및 전신홍반루푸스로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 17

제14항에 있어서,

상기 신경퇴행성 질환은 알츠하이머병, 치매, 다발-경색성 치매, 전두측두치매, 루이소체 치매, 경도인지장애, 피질기저퇴행증, 파킨슨병, 우울증, 대사성 뇌질환, 다계통위축증, 헌팅턴병, 진행성핵상마비, 간질, 척수근위축증, 치상핵적핵담창구시상하핵 위축증, 척수소뇌실조증, 녹내장 (glaucoma), 뇌졸중, 뇌허혈, 뇌염후 파킨슨증, 투렛 증후군, 하지불안 증후군, 주의력결핍 과잉행동장애, 케네디병, 근위축성측삭경화증, 다발성 경화증, 원발성측삭경화증, 및 진행성 구음장애로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 18

제13항에 있어서,

상기 CEACAM 패밀리 단백질은 CEACAM1인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 19

하기의 단계를 포함하는 CEACAM (Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule) 패밀리 단백질을 과발현하도록 유전적으로 조작되어 면역반응 회피능을 획득한 줄기세포의 제조방법:

- (a) CEACAM 패밀리 단백질을 발현하는 바이러스 벡터를 클로닝하는 단계;
- (b) 상기 벡터를 포함하는 바이러스를 제조하는 단계; 및
- (c) 상기 단계 (b)에서 제조한 바이러스를 줄기세포에 감염시켜 CEACAM 패밀리 단백질을 과발현시키는 단계.

청구항 20

제19항에 있어서,

상기 바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 및 파라믹소바이러스 벡터로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 이식편대숙주질환 (GVHD), 아토피피부염, 섬유증과 같은 만성 난치성 질환의 치료를 위한 면역세포 관용성 조절인자 과발현 줄기세포에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 CEACAM (Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule) 패밀리를 과발현하도록 유전적으로 조작되어 면역반응 회피능을 획득한 줄기세포, 상기 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물 및 상기 줄기세포의 제조방법 등에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 중간엽줄기세포 (Mesenchymal stem cell, MSC)는 손상된 조직의 재생과 면역 조절기능이 우수하여, 척추 손상, 심장질환, 퇴행성 뇌질환 뿐만 아니라 이식편대숙주질환 (Graft-versus-host disease, GVHD), 아토피피부염, 섬유증 같은 만성 난치성 질환의 치료제로 사용되고 있다. 특히, MSC는 이식 후 손상 세포의 기능적 회복 및 면역 조절 기능이 뛰어나 여러 난치성 질환 치료제의 중요한 원천으로 사용되나, 생체 내 이식 후 염증 환경에 노출되면 노화 및 면역원성 반응으로 인하여 이식된 MSC의 생존율이 급격하게 감소하기 때문에 줄기세포 치료제로 활용하는 데 한계가 있다. 따라서 MSC 자체의 생존율 증강 기술은 현재 줄기세포 치료제의 한계점을 극복할 수 있는 가장 근본적인 해결책으로 부상하고 있다.

[0003] MSC는 자연살해세포 (Natural killer cells, NK cells) 수용체의 리간드인 ULBPs, PVR 그리고 넥틴-2 등과의 상호작용을 통해 빠르게 사멸되는 것으로 알려져 있다. MSC 생존율은 치료 효과와 직접적인 관련이 있으므로 MSC 자체의 생존율을 향상시켜 치료 효과를 높이기 위해서는 상기 자연살해세포에 의한 면역반응 회피 기술의 개발이 시급한 실정이다. 이러한 기술적 요구에 따라, 최근에는 MSC 생체 이식에 있어서 면역 회피 및 치료 효과를 높이고자 수용체, 성장인자, 사이토카인 등이 과발현된 유전자 조작 MSC가 개발되고 있다.

[0004] 한편, CEACAM1은 제1형 막 단백질로 선택적 스플라이싱 (alternative splicing)에 의해 12개의 동형단백질이 존재하며, 다양한 면역세포 및 암세포에서 발현된다. 그러나 MSC에서 CEACAM 패밀리를 단백질에 대한 기능은 거의 알려진 바가 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) KR 10-2198942 B1

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 CEACAM (Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule) 패밀리를 과발현하도록 유전적으로 조작되어 면역반응 회피능을 획득한 줄기세포를 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 CEACAM 패밀리를 과발현하도록 유전적으로 조작된 줄기세포 또는 상기 줄기세포로부터 분화된 세포를 유효성분으로 함유하는, 세포 손상 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 CEACAM 패밀리를 과발현하도록 유전적으로 조작되어 면역반응 회피능을 획득한 줄기세포의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0009] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 CEACAM (Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule) 패밀리 단백질을 과발현하도록 유전적으로 조작되어 면역반응 회피능을 획득한 줄기세포를 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 CEACAM 패밀리 단백질을 과발현하도록 유전적으로 조작되어 면역반응 회피능을 획득한 줄기세포를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0012] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 CEACAM 패밀리 단백질은 CEACAM1, CEACAM3, CEACAM5, 및 CEACAM6으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0013] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 CEACAM 패밀리 단백질은 CEACAM1일 수 있다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 CEACAM1은 CEACAM1-3L, CEACAM1-3S, CEACAM1-4L 및 CEACAM1-4S로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 줄기세포는 중간엽줄기세포 (Mesenchymal stem cells)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 중간엽줄기세포는 골수 유래 중간엽줄기세포 (Bone marrow-derived mesenchymal stem cells), 지방 유래 중간엽줄기세포 (Adipose-derived mesenchymal stem cells), 제대 유래 중간엽줄기세포 (Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells), 제대혈 유래 중간엽줄기세포 (Umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells), 배아줄기세포 유래 중간엽줄기세포 (Embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells), 및 유도만능줄기세포 유래 중간엽줄기세포 (induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 줄기세포는 면역관문 단백질을 추가로 과발현할 수 있다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 면역관문 단백질은 PD-1, PD-L1, PD-L2, CD47, CD39, CD73, CD200, HVEM, CD155, TIM3, LAG-3, CTLA-4, A2AR, B7-H3, B7-H4, HLA-E, BTLA, IDO, KIR, 및 VISTA로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 줄기세포는 NK 세포 (natural killer cell)에 의한 면역반응을 회피할 수 있다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 NK 세포에 의한 면역반응 회피는 NK 세포의 탈과립 활성 감소에 의한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 줄기세포는 T 세포의 증식을 억제할 수 있다.
- [0022] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 줄기세포는 생체 내 생존율이 향상된 것일 수 있다.
- [0023] 또한, 본 발명은 CEACAM (Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule) 패밀리 단백질을 과발현하도록 유전적으로 조작된 줄기세포, 상기 줄기세포로부터 분화된 세포, 및 상기 줄기세포로부터 유래한 성분으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하는, 세포 손상 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0024] 또한, 본 발명은 CEACAM 패밀리 단백질을 과발현하도록 유전적으로 조작된 줄기세포, 상기 줄기세포로부터 분화된 세포, 및 상기 줄기세포로부터 유래한 성분으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 세포 손상 관련 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [0025] 또한, 본 발명은 CEACAM 패밀리 단백질을 과발현하도록 유전적으로 조작된 줄기세포, 상기 줄기세포로부터 분화된 세포, 및 상기 줄기세포로부터 유래한 성분으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 포함하는

조성물의 세포 손상 관련 질환의 예방 또는 치료 용도를 제공한다.

- [0026] 또한, 본 발명은 EACAM 패밀리 단백질을 과발현하도록 유전적으로 조작된 줄기세포, 상기 줄기세포로부터 분화된 세포, 및 상기 줄기세포로부터 유래한 성분으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 조성물의 세포 손상 관련 질환의 치료용 약제 제조를 위한 용도를 제공한다.
- [0027] 또한, 본 발명은 CEACAM 패밀리 단백질을 과발현하도록 유전적으로 조작된 줄기세포 또는 상기 줄기세포로부터 분화된 세포를 유효성분으로 함유하는, 세포 치료제를 제공한다.
- [0028] 또한, 본 발명은 상기 세포 치료제를 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 세포 손상 관련 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [0029] 또한, 본 발명은 상기 세포 치료제의 세포 손상 관련 질환의 예방 또는 치료 용도를 제공한다.
- [0030] 또한, 본 발명은 세포 손상 관련 질환의 치료용 약제 제조를 위한 상기 세포 치료제의 용도를 제공한다.
- [0031] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 세포 손상 관련 질환은 염증성 질환, 자가면역질환, 신경퇴행성 질환, 및 이식편대숙주질환으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0032] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 염증성 질환은 아토피피부염, 전신 홍반성 루프스, 루프스, 동창성 루프스, 결핵성 루프스, 루프스 신염, 이영양성 수포성 표피박리증, 건선, 류마티스열, 류마티스 관절염, 허리통증, 섬유 근육통, 근막 질환, 미분화 척추관절증, 미분화 관절병증, 관절염, 염증성 골용해, 반응성 관절염, 골관절염, 골괴종, 골다공증, 바이러스 또는 박테리아 감염에 의한 만성 염증질환, 대장염, 궤양성 대장염, 염증성 장질환, 곰팡이 감염, 화상, 외과적 또는 치과적 수술에 의한 상처, 당뇨병부궤양, 타입 1 당뇨병, 타입 2 당뇨병, 궤양성 피부질환, 부비동염, 비염, 결막염, 천식, 피부염, 염증성 콜라겐 혈관 질환, 사구체신염, 뇌염, 염증성 장염, 만성 폐쇄성 폐질환, 폐쇄성 세기관지염 (Bronchiolitis obliterans), 폐혈증, 폐혈성 쇼크 증, 폐섬유증, 아테롬성 동맥경화증, 심근염, 심내막염, 심낭염, 낭성섬유증, 하시모토 갑상선염, 그레이브스병, 나병, 매독, 라임병 (Lyme disease), 보렐리아증 (Borreliosis), 신경성-보렐리아증, 결핵, 사르코이드증 (Sarcoidosis), 황반변성, 포도막염, 과민성 대장 증후군, 크론씨병, 쇼그렌 증후군, 만성피로 증후군, 만성피로 면역부전 증후군, 근육통성 뇌척수염, 근위축성 측삭경화증, 파킨슨병, 및 다발성경화증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0033] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 자가면역질환은 자가면역성 간염, 류마티스성 관절염, 골관절염, 인슐린 의존성 당뇨병, 궤양성 대장염, 크론병, 다발성 경화증, 자가면역성 심근염, 피부경화증, 중증근무력증, 다발성 근육염, 피부 근육염, 하시모토병, 자가면역 혈구감소증, 쇼그렌 증후군, 혈관염 증후군, 및 전신홍반루푸스로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0034] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 신경퇴행성 질환은 알츠하이머병, 치매, 다발-경색성 치매, 전두측두 치매, 루이소체 치매, 경도인지장애, 파킨슨병, 파킨슨증, 우울증, 대사성 뇌질환, 다계통위축증, 헌팅턴 병, 진행성핵상마비, 간질, 척수근위축증, 치상핵적핵담창구시상하핵 위축증, 척수소뇌실조증, 녹내장 (glaucoma), 뇌졸중, 뇌허혈, 뇌염후 파킨슨증, 투렛 증후군, 하지불안 증후군, 주의력결핍 과잉행동장애, 케네디병, 근위축성측삭경화증, 다발성 경화증, 원발성측삭경화증, 및 진행성 구음장애로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0035] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 CEACAM 패밀리 단백질은 CEACAM1일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0036] 또한, 본 발명은 (a) CEACAM 패밀리 단백질을 발현하는 바이러스 벡터를 클로닝하는 단계; (b) 상기 벡터를 포함하는 바이러스를 제조하는 단계; 및 (c) 상기 단계 (b)에서 제조한 바이러스를 줄기세포에 감염시켜 CEACAM 패밀리 단백질을 과발현시키는 단계를 포함하는 CEACAM (Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule) 패밀리 단백질을 과발현하도록 유전적으로 조작되어 면역반응 회피능을 획득한 줄기세포의 제조방법을 제공한다.
- [0037] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 및 파라믹소바이러스 벡터로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0038] 본 발명에 따른 줄기세포 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물은 자연살해세포 (NK cell)의 탈과립과 세포살상 능력을 감소시키고, 줄기세포의 생존율을 증가시키는 효과가 있다. 따라서 본 발명에 따른 면역회피 기능이 획득된 CEACAM 단백질 과발현 줄기세포를 이용하면, 생체 내 생존율을 높여 반복 투여에 의한 부작용을 줄임과 동시에 이식편대숙주질환, 천식, 섬유증 등 다양한 염증성 질환, 자가면역질환 등에 효과적인 세포 치료제로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0039] 도 1a 및 도 1b는 제대-유래 중간엽줄기세포 (UC-MSC)에서 CEACAM1의 개별 동위체 (isoform) 발현을 검증하기 위한 도로서, 도 1a는 유동세포계측 결과를, 도 1b는 역전사 중합효소 연쇄반응 (RT-PCR) 결과를 나타낸 것이다 (4L-MSC, CEACAM1-4L 과발현 MSC; 4S-MSC, CEACAM1-4S 과발현 MSC; 3L-MSC, CEACAM1-3L 과발현 MSC; 및 3S-MSC, CEACAM1-3S 과발현 MSC, 이하 동일).

도 2는 말초혈액 단핵세포 (PBMC) 내 NK, NKT, 및 T 세포의 사이토카인 (PHA-P; 및 IL-12, IL-2, IL-15, 또는 IFN- γ)의 처리에 따른 CEACAM1 발현 패턴을 확인한 도이다.

도 3a 및 도 3b는 CEACAM1 과발현 줄기세포의 ENK 세포독성 저항성을 확인한 도로서, 도 3a는 CEACAM1 과발현 UC-MSC의 생존율을 비교 분석한 그래프이고, 도 3b는 ENK 세포의 탈과립화 활성을 CD107a 발현 정도로 분석한 결과이다.

도 4a 및 도 4b는 CEACAM1 과발현 줄기세포의 말초혈액 단핵세포 (PBMC) 내 NK 세포에 의한 세포독성 저항성을 확인한 도로서, 도 4a는 CEACAM1 과발현 UC-MSC의 생존율을 비교 분석한 그래프이고, 도 4b는 NK 세포의 탈과립화 활성을 CD107a 발현 정도로 분석한 결과이다.

도 5는 CEACAM1 과발현 줄기세포의 NK92 세포주에 의한 세포독성 저항성을 확인한 도이다.

도 6a 및 도 6b는 CEACAM1 과발현 줄기세포의 CD4 T 세포 및 CD8 T 세포 증식 억제능을 확인한 도로서, 도 6a는 CD4 T 세포의 증식률을, 도 6b는 CD8 T 세포의 증식률을 분석한 결과이다 (PBMC+PHA, PHA-P 단독 처리된 PBMC, 이하 동일).

도 7a 내지 도 7f는 CEACAM1 과발현 줄기세포의 CD4 T 세포 (도 7a 내지 도 7c) 및 CD8 T 세포 (도 7d 내지 도 7f) 증식 억제능을 추가로 확인한 도로서, 도 7a 및 도 7d는 CFSE 형광 광도를 비교한 결과이고, 도 7b 및 도 7e는 T 세포의 분열 횟수 및 분열 정도를 측정한 결과이며, 도 7c 및 도 7f는 CD25 수준을 분석한 결과이다.

도 8a 및 도 8b는 CEACAM1 과발현 줄기세포의 CD4 T 세포 및 CD8 T 세포의 사이토카인 생성 억제능을 확인한 도로서, 도 8a는 CD4 T 세포 내 IFN γ 및 TNF α 수준을, 도 8b는 CD8 T 세포 내 IFN γ 및 TNF α 수준을 분석한 결과이다 (EV-MSC는 empty-MSC를 나타냄).

도 9a 및 도 9b는 동물모델을 이용하여 CEACAM1 과발현 줄기세포의 이식편대숙주질환 치료 효과를 확인한 도로서, 도 9a는 CEACAM1 과발현 줄기세포가 주입된 이식편대숙주질환 마우스 모델들의 시간에 따른 체중 변화를, 도 9b는 상기 마우스 모델들의 시간에 따른 생존율을 분석한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0040] 본 발명은 CEACAM1이 과발현된 유전자 조작 줄기세포를 제작하여 면역세포, 특히 자연살해세포 (NK cell)에 대한 면역 회피능을 측정된 결과 NK 세포의 탈과립과 세포 살상 능력이 감소되고, CEACAM1 과발현 줄기세포의 생존율이 증가되는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0041] 본 발명의 일 실시예에서는, 제대-유래 중간엽줄기세포 (UC-MSC)에 렌티바이러스를 이용하여 다양한 동위체의 CEACAM1을 과발현시키고, 본 발명에서 의도한 바와 같이 각각의 CEACAM1 동위체가 특이적으로 발현되는 것을 확인하였다 (실시예 1 참조).

[0042] 본 발명의 다른 실시예에서는, 세포별 CEACAM1 발현 양상을 분석하였고, PHA-P 및 다양한 사이토카인의 조합이 처리된 경우 면역세포에 따라 CEACAM1 발현이 증가함을 확인하였으며, 특히 T 세포의 CEACAM1 발현이 더 증가함을 확인하였다 (실시예 2 참조).

[0043] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 중간엽줄기세포에서 CEACAM1 과발현에 의해 세포 생존율이 증가하였으며, CEACAM1이 ENK 세포의 면역반응을 회피하는데 중요한 인자임을 증명하였다 (실시예 3 참조).

- [0044] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, NK 세포가 MSC의 CEACAM1으로 인해 세포독성 능력이 감소하는 것을 확인하였고, 이는 PBMC 내의 NK 세포가 MSC의 세포사멸에 영향력을 미치며, CEACAM1 발현이 이를 회피하는데 중요한 인자임을 증명하였다 (실시예 4 및 5 참조).
- [0045] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, CEACAM1 과발현 MSC가 T 세포에 대한 증식 억제능을 가지며, 특히 CD8 T 세포 보다는 CD4 T 세포 증식 억제에 더 우세함을 확인하였다 (실시예 6 및 7 참조).
- [0046] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, CEACAM1 과발현 MSC가 중간엽줄기세포의 생존율을 저해할 수 있는 CD4 T 세포 및 CD8 T 세포의 사이토카인 생성을 억제하는 효과가 있음을 확인하였다 (실시예 8 참조).
- [0047] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 이식편대숙주질환 동물모델을 이용하여 CEACAM1 과발현 MSC가 이식편대숙주질환과 같은 면역질환에 대해 우수한 치료 효과를 가짐을 *in vivo* 수준에서 확인하였다 (실시예 9 참조).
- [0048] 따라서 본 발명은 본 발명은 CEACAM (Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule) 패밀리 단백질을 과발현하도록 유전적으로 조작되어 면역반응 회피능을 획득한 줄기세포를 제공할 수 있다.
- [0049] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 CEACAM 패밀리 단백질을 과발현하도록 유전적으로 조작되어 면역반응 회피능을 획득한 줄기세포 조성물을 제공할 수 있다.
- [0050] 본 명세서에서 사용된 용어 “유전적 조작 (genetic engineering)” 또는 “유전적으로 조작된 (genetically engineered)” 은, 세포에 대하여 하나 이상의 유전적 변형 (genetic modification)을 도입하는 행위 또는 그에 의하여 만들어진 세포를 나타낸다. 예를 들면, 상기 줄기세포는 CEACAM 패밀리 단백질을 또는 그의 활성 단편의 발현 또는 활성이 증가되도록 유전적으로 조작된 것, 예를 들면, CEACAM1 또는 그의 활성 단편을 코딩하는 외인성 유전자를 포함하는 것일 수 있다.
- [0051] 상기 활성 증가는 주어진 유전적으로 조작되지 않은 모세포 (예: 야생형)가 갖지 않는 또는 갖는 내재적 단백질을 또는 효소의 활성에 비해, 동일한 타입의 단백질 또는 효소의 활성이 보다 더 높은 활성을 갖는 것을 의미할 수 있다.
- [0052] 상기 외인성 유전자는, 상기 중간엽 줄기세포 또는 숙주 세포에서 그 모세포에 비하여 언급된 단백질의 활성이 증가되기에 충분한 양으로 발현된 것일 수 있다. 상기 외인성 유전자는 발현 벡터를 통하여 모세포 내로 도입된 것일 수 있다. 또한, 상기 외인성 유전자는 선형 폴리뉴클레오티드 형태로 모세포 내로 도입된 것일 수 있다. 또한, 상기 외인성 유전자는 세포 내에서 발현 벡터 (예: 플라스미드)로부터 발현되는 것일 수 있다. 또한, 상기 외인성 유전자는 안정적인 발현을 위하여 세포 내의 유전물질 (예: 염색체)에 삽입되어 발현되는 것일 수 있다.
- [0053] 상기 CEACAM 패밀리 단백질 또는 그의 활성 단편은 융합 단백질로서 제조될 수 있다. 융합 단백질을 제조하기 위한 방법에서, CEACAM 패밀리 단백질 또는 그의 활성 단편을 암호화하고 있는 폴리뉴클레오티드는 다른 단백질 또는 펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드와 프레임 (frame)에 연결 (ligate)될 수 있으며, 이것은 숙주 (host)에서의 발현 (expression)을 위해 발현 벡터에 삽입될 수 있다. 당업계에 알려진 기술들은 이런 목적을 위해 이용될 수 있다. CEACAM 패밀리 단백질과 융합된 펩타이드들을 위해, FLAG, 6개의 히스티딘 (His)으로 이루어진 6x His 잔기들 (residues), 10x His, influenza hemagglutinin (HA), 인간 cmc 단편, VSV-GP 단편, p18HIV 단편, T7-태그 (tag), HSV-태그, E-태그, SV40T 항원 단편, lck 태그, 알파-튜블린 (alpha-tubulin) 단편, B-태그, 및 Protein C 단편과 같이 알려진 펩타이드를 사용할 수 있다. 또한, 융합 단백질을 만들기 위해 CEACAM 패밀리 단백질 또는 그의 활성 단편을 글루타치온-S-트랜스퍼라아제 (glutathione-S-transferase, GST), influenza hemagglutinin (HA), immunoglobulin constant regions, 베타-갈락토시다아제 (beta-galactosidase), 말토즈-결합 단백질 (maltose-binding protein, MBP) 등을 연결하는 것이 가능하다.
- [0054] 본 발명에 있어서, 상기 CEACAM 패밀리 단백질은 CEACAM1, CEACAM3, CEACAM4, CEACAM5, CEACAM6, CEACAM7, CEACAM8, CEACAM16, CEACAM18, CEACAM19, CEACAM20, 및 CEACAM21로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있고, 바람직하게는 CEACAM1, CEACAM3, CEACAM5, 및 CEACAM6으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으며, 보다 바람직하게는 CEACAM1일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0055] 본 명세서에서 사용된 용어 “CEACAM1” 은, CEACAM1 유전자의 단백질 생성물, 예컨대, NP_001020083.1, NP_001703.2를 지칭하는 것으로 사용된다. 현재까지 인간에서는 12종의 상이한 CEACAM1 스포라이스 변이체가 검출되었다. 개별 CEACAM1 이소형은 세포의 면역글로불린 유사 도메인의 수 (예를 들어, 세포의 면역글로불린 유사 도메인을 4개 가지는 CEACAM1은 CEACAM1-4로 공지되어 있다), 그의 세포질 테일의 막 부착 및/또는 길이 (예

를 들어, 긴 세포질 테일을 가지는 CEACAM1-4는 CEACAM1-4L로서 공지되어 있고, 짧은 세포질 테일을 가지는 CEACAM1-4는 CEACAM1-4S로서 공지되어 있다)와 관련하여 상이하다. CEACAM1의 N-말단 도메인은 신호 펩티드 바로 다음에서 출발하고, 그의 구조는 IgV형으로 간주된다. 예를 들어, CEACAM1 주식 P13688에 있어서, N-말단 IgV형 도메인은 아미노산 35 내지 142의 108개 아미노산으로 구성되어 있다. 이 도메인은 동종 친화성 결합 활성을 담당하는 것으로 확인되었다 (문헌 [Watt *et al.*, 2001, Blood. 98, 1469-79]). 이들 스플라이스 변이체를 비롯한, 모든 변이체는 용어 “CEACAM1”에 포함된다.

[0056] 본 발명에 있어서, 상기 CEACAM1은 CEACAM1-3L, CEACAM1-3S, CEACAM1-4L 및 CEACAM1-4S로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0057] 바람직하게는, 본 발명에 따른 CEACAM1-4L 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 바람직하게는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어질 수 있으나 이에 제한되지 않으며, 상기 아미노산 서열의 변이체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 즉, 본 발명의 서열번호 2로 이루어지는 폴리펩티드는 이를 구성하는 폴리펩티드의 작용성 등가물, 예를 들어, 폴리펩티드의 일부 아미노산 서열이 결실 (deletion), 치환 (substitution) 또는 삽입 (insertion)에 의해 변형되었지만, 상기 폴리펩티드와 기능적으로 동일한 작용을 할 수 있는 변이체 (variants)를 포함하는 개념이다. 구체적으로, 상기 CEACAM1-4L 단백질을 코딩하는 폴리펩티드는 서열번호 2로 표시되는 어느 하나의 아미노산 서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 예를 들면, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%의 서열 상동성을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 폴리펩티드에 대한 “서열 상동성의 %”는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리펩티드의 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 CEACAM1-4L 단백질은 서열번호 1의 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩될 수 있고, 바람직하게는 서열번호 1의 핵산 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 상기 폴리뉴클레오티드의 변이체가 본 발명의 범위 내에 포함된다.

[0058] 바람직하게는, 본 발명에 따른 CEACAM1-4S 단백질은 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드에 의해 코딩될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 즉, 상기 CEACAM1-4S 단백질은 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 CEACAM1-4S 단백질은 서열번호 3의 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩될 수 있고, 바람직하게는 서열번호 3의 핵산 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 상기 폴리뉴클레오티드의 변이체가 본 발명의 범위 내에 포함된다.

[0059] 바람직하게는, 본 발명에 따른 CEACAM1-3L 단백질은 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드에 의해 코딩될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 즉, 상기 CEACAM1-3L 단백질은 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 CEACAM1-3L 단백질은 서열번호 5의 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩될 수 있고, 바람직하게는 서열번호 5의 핵산 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 상기 폴리뉴클레오티드의 변이체가 본 발명의 범위 내에 포함된다.

[0060] 바람직하게는, 본 발명에 따른 CEACAM1-3S 단백질은 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 8의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드에 의해 코딩될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 즉, 상기 CEACAM1-3S 단백질은 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 CEACAM1-3S 단백질은 서열번호 7의 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩될 수 있고, 바람직하게는 서열번호 7의 핵산 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 상기 폴리뉴클레오티드의 변이체가 본 발명의 범위 내에 포함된다.

[0061] 본 발명에 있어서, 상기 줄기세포는 중간엽줄기세포 (Mesenchymal stem cells)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0062] 본 명세서에서 사용된 용어, “중간엽줄기세포 (Mesenchymal Stem Cell, MSC)”는 자기재생능력 (self-

renewal)과 줄기세포능 (stemness maintenance)을 유지하고 다양한 간엽 조직으로 분화할 수 있는 세포를 의미할 수 있고, 포유류, 예를 들면 인간을 포함한 동물의 중간엽줄기세포를 포함할 수 있다.

[0063] 상기 중간엽줄기세포는 배낭, 태반, 제대, 제대혈, 피부, 말초혈액, 골수, 지방, 근육, 간, 신경조직, 골막, 태아막, 활액막, 활액, 양막, 반월상연골, 전십자 인대, 관절 연골세포, 유치, 혈관주위세포, 지주골, 슬개골하지방괴, 비장, 흉선 등의 조직으로부터 분리된 것일 수 있으며, 바람직하게는 골수 유래 중간엽줄기세포 (Bone marrow-derived mesenchymal stem cells), 지방 유래 중간엽줄기세포 (Adipose-derived mesenchymal stem cells), 제대 유래 중간엽줄기세포 (Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells), 제대혈 유래 중간엽줄기세포 (Umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells), 배아줄기세포 유래 중간엽줄기세포 (Embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells), 유도만능줄기세포 유래 중간엽줄기세포 (induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells) 등을 이용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 줄기세포의 유래는 치료 목적 및 원하는 효과에 따라 당업자가 적절하게 선택할 수 있다.

[0064] 또한, 상기 중간엽줄기세포는 대안적으로 그의 배양물, 용해물 또는 그의 추출물이 이용될 수 있다. 상기 배양물, 용해물 또는 추출물은 세포 그대로를 이용하기 어려운 경우 유용한 대안이 될 수 있으며, 단백질 등을 포함한 세포의 구성 성분을 포함하고 있으므로 본래 세포와 유사하거나 동등한 생물학적 활성을 나타낼 수 있다. 상기 용해물 또는 추출물은 상업적으로 이용가능한 세포 용해 키트, 또는 추출 키트 등을 이용하여 얻을 수 있다.

[0065] 본 발명에 있어서, 상기 줄기세포는 면역관문 단백질을 추가로 과발현할 수 있으며, 상기 면역관문 단백질의 비제한적인 예로는 PD-1, PD-L1, PD-L2, CD47, CD39, CD73, CD200, HVEM, CD155, TIM3, LAG-3, CTLA-4, A2AR, B7-H3, B7-H4, HLA-E, BTLA, IDO, KIR, 및 VISTA 이들의 조합 등일 수 있다. 본 발명에 따른 줄기세포는 상기 면역관문 단백질을 추가로 발현함으로써 생존율이 더욱 더 증진될 수 있으며, 추가적인 면역 조절 기능도 가지게 될 수 있다.

[0066] 본 발명에 있어서, 상기 줄기세포는 NK 세포 (natural killer cell)에 의한 면역반응을 회피할 수 있다.

[0067] 본 명세서에서 사용된 용어, “자연살해세포 (Natural Killer cell)” 또는 “NK 세포”는 선천성 면역계의 주요 성분을 구성하는 세포독성 림프구로서, 대형과립림프구 (large granular lymphocyte, LGL)로 정의되고 림프계 전구세포 (common lymphoid progenitor, CLP) 생성 B 및 T 림프구로부터 분화된 제3의 세포를 구성한다. 상기 “자연살해세포” 또는 “NK 세포”는 임의의 조직 공급원 (source)으로부터 유래된 추가적인 변형이 없는 자연살해세포를 포함하고, 성숙한 자연살해세포뿐 아니라, 자연살해 전구세포를 포함할 수 있다. 상기 자연살해세포는 인터페론 또는 대식세포-유래 사이토카인에 대한 반응으로 활성화되고, 자연살해 세포는 “활성화 수용체” 및 “억제성 수용체”로 표지되는, 세포의 세포 독성 활성을 제어하는 2가지 유형의 표면 수용체를 포함한다. 자연살해세포는 임의의 공급원, 예를 들어 태반 조직, 태반 관류액, 제대혈, 태반혈, 말초혈, 지라, 간 등으로부터의 조혈세포, 예를 들어 조혈 줄기 또는 전구체로부터 생성될 수 있다.

[0068] 본 명세서에서 사용된 용어 “면역반응 회피”는 외부에서 투여/이식된 줄기세포의 생존율을 최대화하거나 허용하기 위해 줄기세포에 의한 대상(또는 숙주)의 면역계 또는 이의 성분 (예컨대, NK 세포의 반응)을 억제하는 것을 지칭한다.

[0069] 본 발명에 있어서, 상기 NK 세포에 의한 면역반응 회피는 NK 세포의 탈과립 활성 감소에 의한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0070] 본 발명에 있어서, 상기 줄기세포는 T 세포의 증식을 억제할 수 있으며, 상기 NK 세포 활성 감소와 더불어 줄기세포의 생체 내 생존을 향상 효과를 불러온다.

[0072] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 CEACAM (Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule) 패밀리를 단백질질을 과발현하도록 유전적으로 조작된 줄기세포, 상기 줄기세포로부터 분화된 세포, 및 상기 줄기세포로부터 유래한 성분으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하는, 세포 손상 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0073] 즉, 본 발명에 따른 조성물은 CEACAM 패밀리를 단백질질을 과발현하는 줄기세포로부터 유래된 성분으로서, 상기 줄기세포의 특성 내지 기능을 발휘할 수 있는 것이라면 제한 없이 이에 포함될 수 있다. 구체적으로, 본 발명에 있어서 상기 줄기세포로부터 유래한 성분이란 CEACAM 과발현 줄기세포 자체는 물론, 이의 배양물, 용해물, 및 추출물을 포함하는 개념이다. 본 발명에서 사용되는 용어, “배양물”은 본 발명에 따른 CEACAM 과발현 줄기세포

를 적합한 액체 배지에서 배양한 배양액 자체, 상기 배양액을 여과 또는 원심분리하여 CEACAM 과발현 줄기세포를 제거한 여액 (여과액 또는 원심분리한 상등액), 상기 배양액을 초음파 처리하거나 상기 배양액에 용해효소 (lysozyme)를 처리하여 수득한 세포 파쇄액 등을 포함하며, 바람직하게는 원심분리 후 상층액을 의미하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 배양액은 배양액의 농축액 및 상기 배양액의 건조물을 모두 포함할 수 있다.

[0074] 더욱 구체적으로, 본 발명에 있어서 줄기세포로부터 유래한 성분은 본 발명에 따른 CEACAM 과발현 줄기세포로부터 생성된 탄수화물, 지질, 단백질 (펩티드 포함), 당단백질, 올리고뉴클레오타이드, 비타민, 기타 대사산물 등은 물론, 세포의 소포체 (extracellular vesicles)도 포함한다. 본 발명에 있어서, “세포의 소포체”란 세포막의 구조와 동일한 이중인지질막으로 이루어진 수십 내지 수백 나노미터 (바람직하게는 약 20 내지 300 nm) 크기의 막 구조체를 의미한다 (단, 분리 대상이 되는 줄기세포 종류, 분리 방법 및 측정방법에 따라 엑소좀의 입자 크기는 달라질 수 있다). 세포의 소포체에는 세포가 생성한 다양한 당, 단백질, miRNA, mRNA, DNA 등이 카고 (cargo)로 포함되어 있는데, 이들 카고는 세포 종류에 따라 특이적이다. 이처럼, 세포의 소포체는 세포가 생성한 생물학적 활성 물질들을 포함하여 세포로부터 분리되기 때문에, 세포의 소포체는 해당 세포의 특성을 공유하며, 따라서 그 자체로서 세포의 생물학적 활성을 발휘할 수 있다. 본 발명에 있어서, “세포의 소포체”는 엑소좀 (exosome) 및 미세소포체 (microvesicle), 세포막 유래 소포체 (membrane vesicles), 엑토좀 (ectosomes), shedding 소포체 (shedding vesicles), 마이크로파티클 (microparticles), 또는 이의 등가물을 포괄하는 의미이다.

[0075] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 CEACAM 패밀리를 단백질과 과발현하도록 유전적으로 조작된 줄기세포 또는 상기 줄기세포로부터 분화된 세포를 유효성분으로 함유하는, 세포 치료제를 제공한다.

[0076] 본 명세서에서 사용된 용어 “세포 치료제”는 사람으로부터 분리, 배양 및 특수한 저장을 통해 제조된 세포 및 조직으로 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품 (미국 FDA규정)으로서, 세포 혹은 조직의 기능을 복원시키기 위하여 살아있는 자가, 동종, 또는 이종세포를 체외에서 증식 및/또는 선별하거나 다른 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등의 일련의 행위를 통하여 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품을 지칭한다. 세포 치료제는 세포의 분화정도에 따라 크게 체세포 치료제, 줄기세포 치료제로 분류되며 본 발명은 특히 줄기세포 치료제에 관한 것이다.

[0077] 본 발명에 있어서, 상기 세포 손상 관련 질환은 염증성 질환, 자가면역질환, 신경퇴행성 질환, 및 이식편대숙주 질환으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0078] 본 발명에 있어서, 상기 염증성 질환의 비제한적인 예로는 아토피피부염, 전신 홍반성 루프스, 루프스, 동창성 루프스, 결핵성 루프스, 루프스 신염, 이영양성 수포성 표피박리증, 건선, 류마티스열, 류마티스 관절염, 허리통증, 섬유 근육통, 근막 질환, 미분화 척추관절증, 미분화 관절병증, 관절염, 염증성 골융해, 반응성 관절염, 골관절염, 공피증, 골다공증, 바이러스 또는 박테리아 감염에 의한 만성 염증질환, 대장염, 궤양성 대장염, 염증성 장질환, 곰팡이 감염, 화상, 외과적 또는 치과적 수술에 의한 상처, 당뇨병부패양, 타입 1 당뇨병, 타입 2 당뇨병, 궤양성 피부질환, 부비동염, 비염, 결막염, 천식, 피부염, 염증성 콜라겐 혈관 질환, 사구체신염, 뇌염, 염증성 장염, 만성 폐쇄성 폐질환, 폐쇄성 세기관지염 (Bronchiolitis obliterans), 폐혈증, 폐혈성 쇼크 증, 폐섬유증, 아테롬성 동맥경화증, 심근염, 심내막염, 심낭염, 낭성섬유증, 하시모토 갑상선염, 그레이브스병, 나병, 매독, 라임병 (Lyme disease), 보렐리아증 (Borreliosis), 신경성-보렐리아증, 결핵, 사르코이드증 (Sarcoidosis), 황반변성, 포도막염, 과민성 대장 증후군, 크론씨병, 쇼그렌 증후군, 만성피로 증후군, 만성피로 면역부전 증후군, 근육통성 뇌척수염, 근위축성 측삭경화증, 파킨슨병, 다발성경화증 등이 있다.

[0079] 상기 자가면역질환의 비제한적인 예로는, 자가면역성 간염, 류마티스성 관절염, 골관절염, 인슐린 의존성 당뇨병, 궤양성 대장염, 크론병, 다발성 경화증, 자가면역성 심근염, 피부경화증, 중증근무력증, 다발성 근육염, 피부 근육염, 하시모토병, 자가면역 혈구감소증, 쇼그렌 증후군, 혈관염 증후군, 전신홍반루프스 등이 있다.

[0080] 상기 신경퇴행성 질환의 비제한적인 예로는, 알츠하이머병, 치매, 다발-경색성 치매, 전두측두치매, 루이소체 치매, 경도인지장애, 파킨슨병, 파킨슨증, 우울증, 대사성 뇌질환, 다계통위축증, 헌팅턴병, 진행성핵상 마비, 간질, 척수근위축증, 치상핵적핵담창구시상하핵 위축증, 척수소뇌실조증, 녹내장 (glaucoma), 뇌졸중, 뇌허혈, 뇌염후 파킨슨증, 투렛 증후군, 하지불안 증후군, 주의력결핍 과잉행동장애, 케네디병, 근위축성측삭경화증, 다발성 경화증, 원발성측삭경화증, 진행성 구음장애 등이 있다.

[0081] 본 발명에 있어서, 상기 CEACAM 패밀리를 단백질은 전술한 바와 같이 CEACAM1, CEACAM3, CEACAM4, CEACAM5, CEACAM6, CEACAM7, CEACAM8, CEACAM16, CEACAM18, CEACAM19, CEACAM20, CEACAM21 중 어느 하나일 수 있으며,

바람직하게는 CEACAM1일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0082] 한편, 본 발명의 약학적 조성물 내의 상기 CEACAM 단백질이 과발현된 중간엽줄기세포의 함량은 질환의 증상, 증상의 진행 정도, 환자의 상태 등에 따라서 적절히 조절 가능하며, 예컨대, 전체 조성물 중량을 기준으로 0.0001 내지 99.9 중량%, 또는 0.001 내지 50 중량%일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 함량비는 용매를 제거한 건조량을 기준으로 한 값이다.
- [0083] 본 발명에 따른 조성물은 유효성분을 단독으로 포함하거나, 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함하여 약학적 조성물로 제공될 수 있다.
- [0084] 구체적으로, 상기 담체는 예를 들어, 콜로이드 현탁액, 분말, 식염수, 지질, 리포솜, 미소구체 (microspheres) 또는 나노 구형입자일 수 있다. 이들은 운반 수단과 복합체를 형성하거나 관련될 수 있고, 지질, 리포솜, 미세입자, 금, 나노입자, 폴리머, 축합 반응제, 다당류, 폴리아미노산, 텐드리머, 사포닌, 흡착 증진 물질 또는 지방산과 같은 당업계에 공지된 운반 시스템을 사용하여 생체 내 운반될 수 있다.
- [0085] 상기 약학적 조성물이 제제화될 경우에는 통상적으로 사용하는 윤활제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제, 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함될 수 있고, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트 (calciumcarbonate), 수크로스 (sucrose) 또는 락토오스 (lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며, 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (propyleneglycol), 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔 (witepsol), 마크로골, 트윈 (Tween[®]) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로 제라틴 등이 사용될 수 있고, 점안제 형태로 제조 시 공지의 희석제 또는 부형제 등이 사용될 수 있다.
- [0086] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, “약학적으로 유효한 양”은 의학적인 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [0087] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 본 발명이 속하는 기술분야에 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0088] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구 복용, 피하 주사, 복강 투여, 정맥 주사, 근육 주사, 척수 주위 공간(경막내) 주사, 설하 투여, 볼점막 투여, 직장 내 삽입, 질 내 삽입, 안구 투여, 귀 투여, 비강 투여, 흡입, 입 또는 코를 통한 분무, 피부 투여, 경피 투여 등에 따라 투여될 수 있다.
- [0089] 본 발명의 약학적 조성물은 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 질환의 중증도 등의 여러 관련 인자와 함께 활성성분인 약물의 종류에 따라 결정된다.
- [0090] 본 발명에서 “개체”란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐 (mouse), 쥐 (rat), 개, 고양이, 말, 및 소 등의 포유류를 의미한다.
- [0091] 본 발명에서 “투여”란 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.
- [0092] 본 발명에서 “예방”이란 목적하는 질환의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미하고, “치료”란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 그에 따른 대사 이상 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

- [0094] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 (a) CEACAM 패밀리 단백질을 발현하는 바이러스 벡터를 클로닝하는 단계; (b) 상기 벡터를 포함하는 바이러스를 제조하는 단계; 및 (c) 상기 단계 (b)에서 제조한 바이러스를 줄기세포에 감염시켜 CEACAM 패밀리 단백질을 과발현시키는 단계를 포함하는 CEACAM (Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule) 패밀리 단백질을 과발현하도록 유전적으로 조작되어 면역반응 회피능을 획득한 줄기세포의 제조방법을 제공할 수 있다.
- [0095] 본 발명에 있어서, 상기 바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 및 파라믹소바이러스 벡터로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0096] 본 명세서에서 사용된 용어 “벡터 (vector)” 는, 숙주 세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단을 의미한다. 예를 들어, 상기 열거한 벡터 외에도 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파지 벡터, 및 아데노-연관 바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터를 포함한다. 상기 재조합 벡터로 사용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드 (예를 들면, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pH79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC19 등), 파지 또는 바이러스 (예를 들면, SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.
- [0097] 상기 재조합 벡터에서 상기 단백질 복합체를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 상기 용어 “작동 가능하게 연결된 (operatively linked)” 은 뉴클레오타이드 발현 조절 서열 (예를 들어, 프로모터 서열)과 다른 뉴클레오타이드 서열 사이의 기능적인 결합을 의미한다. 상기 조절 서열은 “작동 가능하게 연결 (operatively linked)” 됨으로써 다른 뉴클레오타이드 서열의 전사 및/또는 해독을 조절할 수 있다.
- [0098] 상기 재조합 벡터는, 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 상기 발현용 벡터는 당업계에서 식물, 동물 또는 미생물에서 외래의 단백질을 발현하는 데 사용되는 통상의 것을 사용할 수 있다. 상기 재조합 벡터는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있다.
- [0100] 본 명세서 및 청구범위에 사용된 용어나 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정해서 해석되어서는 아니 되며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다.
- [0101] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0103] [실시예]

[0104] 실험 재료 및 방법

[0105] 1. CEACAM1 발현용 렌티바이러스의 제작

[0106] CEACAM1 단백질의 과발현을 위한 렌티바이러스 제작을 위해, 4종의 CEACAM1 동위체 (isoform)에 대한 cDNA 서열을 인티그레이티드 DNA 테크놀로지스 사 (Integrated DNA Technologies, 미국)에 의뢰하여 합성하였다. 상기 cDNA 서열 및 이에 의해 코딩되는 단백질에 대한 정보는 하기 표 1 및 서열목록에 기재하였다.

표 1

[0107]

이름	NCBI 레퍼런스 번호	종류	서열목록 번호
CEACAM1-4L	NM_001712.5	DNA	서열번호 1
		Protein	서열번호 2
CEACAM1-4S	NM_001024912.2	DNA	서열번호 3
		Protein	서열번호 4
CEACAM1-3L	NM_001184813.1	DNA	서열번호 5
		Protein	서열번호 6
CEACAM1-3S	NM_001184816.1	DNA	서열번호 7
		Protein	서열번호 8

[0109] 상기 4종의 CEACAM1 cDNA 서열을 pCDH-CMV-EF1 α -GFP-Puro (System Biosciences, 미국) 플라스미드의 *Xba*I과 *Eco*RI 제한효소 위치 사이에 삽입하였다. 293TN 세포주 (System Biosciences, 미국)는 10% FBS (Gibco[®]), 1% GlutaMax (Gibco[®]) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신 (Gibco[®])이 보충된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Gibco[®], Thermo Fisher Scientific, 미국) 배지에서 배양하였다. 293TN 세포주를 6-well 플레이트에서 16시간 동안 배양한 후, CEACAM1이 클로닝 되어있는 pCDH-CMV-EF1 α -GFP-Puro와 psPAX2 (Addgene, 미국) 및 pMD2.G (Addgene)를 섞은 총 2.22 μ g의 플라스미드와 X-tremeGENE 9 (Roche, 스위스)을 제조사의 지침에 따라 배합한 후 293TN 세포주에 처리하고, 24시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 환경에서 배양하였다. 이후, 새로운 배지로 교체하여 2일간 추가 배양하였다. 배양액을 회수하여 1,500 rpm, 3분, -2 내지 -8 $^{\circ}$ C 조건으로 원심분리를 수행한 후, 상층액을 취하여 0.45 μ m 규격 필터로 여과한 다음 새로운 튜브에 옮겨 담았다. 바이러스 역가 측정을 위하여 293TN 세포주에 10⁻¹ 내지 10⁻⁵ 농도로 희석한 바이러스 배양액을 접종하고 48시간 후 GFP 발현 세포를 유동세포계측기(flow cytometry)로 분석하였다. 바이러스 역가는 다음과 같은 방법으로 계산되었다:

[0110] 바이러스 역가 (Transduction Unit/mL, TU/mL) = 세포 수 $\times$ % GFP $\times$ 희석배수 / 접종 부피

[0112] 2. CEACAM1 과발현 줄기세포의 제작

[0113] CEACAM1 과발현을 위한 줄기세포는 제대 조직에서 유래한 중간엽줄기세포(Umbilical cord-derived mesenchymal stem cell; UC-MSC)를 사용하였다. UC-MSC는 10% FBS (Gibco[®]), 1% GlutaMax (Gibco[®]) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신 (Gibco[®])이 보충된 MEM- α (Gibco[®])배지에서 3일 내지 4일간 배양하였다. 배양 후, 상기 UC-MSC를 Accutase[®] (Innovative Cell Technologies, 미국)를 사용하여 배양 용기로부터 부드럽게 수거하여 웬티바이러스 접종 하루 전 날 T25 플라스크 (Corning, 미국)에 심어두었다. 다음 날, 4 MOI (multiplicity of infection)의 웬티바이러스를 10 μ g/ml의 폴리브렌 (polybrene; Sigma, 미국)과 함께 48시간 동안 감염시켰다. 이후, 배양액을 제거하고 2.5 μ g/ml의 퓨로마이신 (Merck, 미국)이 포함된 배양액으로 8일간 배양하였다. CEACAM1 발현은 세포 표면 염색 또는 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)으로 확인하였다.

[0115] 3. 단백질 및 RNA 발현 확인

[0116] 세포 표면의 발현을 확인하기 위하여, 상기 UC-MSC들의 Fc 수용체를 Fc 수용체 결합 억제제 다클론 항체 (Fc Receptor Binding Inhibitor Polyclonal Antibody; Invitrogen, 미국)로 4 $^{\circ}$ C에서 15분간 인큐베이션하였다. 이후, PE-CEACAM1 (R&D systems, 미국)으로 상온, 암실 환경에서 30분간 인큐베이션하고, FACS (Fluorescence activated cell sorter) 완충액으로 2회 세척한 후 유동세포계측기로 분석하였다.

[0117] CEACAM1의 동위체 종류별 RNA 발현을 확인하기 위하여, UC-MSC들을 Trizol RNA 분리 시약 (Invitrogen)으로 제조사의 지침에 따라 분리하였다. 그리고 1 μ g의 RNA를 ReverTra Ace[™] qPCR RT 키트 (TOYOBO, 일본)를 사용하여 cDNA로 합성 한 후, 하기 표 2의 프라이머를 사용하여 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 94 $^{\circ}$ C에서 45초, 64 $^{\circ}$ C에서 45초, 72 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 10분의 조건으로 30 사이클을 반복하여 중합효소 연쇄반응을 실시하였다. 반응물의 사이즈를 확인하기 위하여 4% UltraPure[™] 아가로스 겔 (Invitrogen)에 전기영동 하였다.

표 2

프라이머	방향	서열	서열목록 번호
CEACAM1-F	정방향	NM_001712.5	서열번호 9
CEACAM1-L	역방향	NM_001024912.2	서열번호 10
CEACAM1-S	역방향	NM_001184813.1	서열번호 11

4. 세포별 CEACAM1 발현 확인

NK92 세포주 (ATCC, 미국)는 20% FBS (Gibco®), 1% 비타민 수용액, 1% 페니실린/스트렙토마이신 (Gibco®), 0.1 mM 2-머캅토에탄올 (Gibco®)이 보충된 MEM-α (Gibco®)배지에서 배양되었다.

저온보존된 (Cryopreserved) 말초혈액 단핵세포 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC)를 해동하여 10% FBS (Gibco®), 1% Glutamax™ (Gibco®) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신 (Gibco®)이 보충된 RPMI1640 (Gibco®) 배지에 풀어주었다. 20 μg/ml의 PHA-P (Phytohemagglutinin P; Sigma)와 10 ng/ml의 IL-12p70 (Peprotech, 미국), 200 Unit/ml의 IL-2 (Roche), 10 ng/ml의 IL-15 (Peprotech) 또는 10 ng/ml의 IFN-γ (Peprotech)가 첨가된 배지에서 2일 내지 3일 동안 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다. NK92 세포주 또는 사전-활성화된 (pre-activated) PBMC를 회수하여 FACS 완충액으로 1회 세척한 뒤, 세포의 Fc 수용체를 Fc 수용체 결합 억제제 다클론 항체 (Invitrogen)로 4°C에서 15분간 인큐베이션하였다. 그리고 세포 표면 마커로 FITC-CD56 (NCAM16.2; BD Bioscience, 미국), PE-CEACAM1 (283340; R&D system), PerCP-CD3 (SK7; BD Bioscience)를 사용하여 상온 및 암실 환경에서 30분간 인큐베이션하였다. FACS 완충액으로 2회 세척한 후 유동세포계측기로 분석하였다.

5. NK 세포의 세포독성 (Cytotoxicity) 활성 분석

3일에서 4일간 배양된 UC-MSCs를 배양 용기에서 떼어낸 다음, BATDA 라벨링 시약 (PerkinElmer, 미국)을 최종 40 μM로 넣어주고 37°C에서 30분간 표지하였다. BATDA로 표지된 UC-MSC와 ENK 세포 (Expanded NK cell) 또는 PHA와 IL-2로 2일간 사전 활성화된 PBMC를 96-well V bottom 플레이트에 함께 넣고 37°C, 5% CO₂ 환경의 인큐베이터에서 2시간 (ENK) 또는 4시간 (사전 활성화된 PBMC) 배양하였다. 혹은, NK92 세포주와 함께 3시간 배양을 하였다. 이후 원심분리 (1500 rpm, 3분)를 통해 배양액을 회수하고 세포 용해를 통해 배출된 배양액 속의 TDA를 DELFIA® Eu-Solution (PerkinElmer) 형광 염료에 넣어주었다. 형광 정도는 마이크로플레이트 리더 (Ex/Em, 340nm/615nm)를 통해 분석하였고, 특이적 세포용해(specific lysis) 정도는 다음과 같은 방법으로 계산되었다.

$$\% \text{ Specific lysis} = \frac{\text{Experimental release (counts)} - \text{Spontaneous release (counts)}}{\text{Maximum release (counts)} - \text{Spontaneous release (counts)}} \times 100$$

6. NK 세포의 탈과립화 (degranulation) 활성 분석

ENK 세포 또는 사전-활성화된 PBMC의 NK 세포독성 활성 분석 후, 남아있는 세포의 탈과립화 (degranulation) 활성 분석을 수행하기 위해 Fc 수용체를 Fc 수용체 결합 억제제 다클론 항체 (Invitrogen)로 4°C에서 15분간 인큐베이션하였다. 이후 세포 표면 마커를 FITC-CD107a (H4A3; BD Bioscience), PE-CD56 (NCAM16.2; BD Bioscience), PerCP-CD3 (SK7; BD Bioscience)로 4°C 암실에서 30분간 인큐베이션하였다. FACS 완충액으로 세포를 2회 세척한 후 유동세포계측기로 분석하였다.

7. T 세포 증식 억제 분석

저온보존된 PBMC를 해동하고 10% FBS, 1% Glutamax™ (Gibco®), 1% 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 RPMI1640 배지에 풀어 3시간 동안 휴지시켰다. 이후 PBMC를 회수하고 1 μM의 CellTrace™ CFSE 세포 증식 키트 (Carboxyfluorescein succinimidyl ester Cell Proliferation Kit; Invitrogen)를 이용하여 37°C 항온수조에서 10분 동안 인큐베이션하여 표지하였다. 10배 부피의 RPMI1640 배지를 첨가하여 원심분리 (1400 rpm, 5분)하고 3회 세척하였다. 3일에서 4일간 배양된 MSC를 배양 용기에서 떼어내고, 1:5 (MSC:PBMC) 비율로 20 μg/ml의 PHA-P (Sigma)와 함께 37°C, 5% CO₂ 환경의 인큐베이터에서 5일간 배양하였다. 이후, 배양된 세포를 FACS 완충액으로 1회 세척한 후, 세포의 Fc 수용체를 Fc 수용체 결합 억제제 다클론 항체 (Invitrogen)로 4°C에서 15분간 인큐베이션하였다. 이후 CD4 T 세포는 PE-CD25 (M-A251; BD Bioscience), PerCP-CD3 (SK7; BD Bioscience), APC-CD4 (SK3; BD Bioscience) 마커로, CD8 T 세포는 PE-CD25 (M-A251; BD Bioscience), PerCP-CD3 (SK7; BD Bioscience), APC-CD8 (SK1; BD Bioscience) 마커로 4°C의 암실에서 30분간 인큐베이션하여 표지하였다. 이후

FACS 완충액으로 세포를 2회 세척한 후 유동세포계측기로 분석하였다.

8. T 세포의 활성화, 및 IFN γ 및 TNF α 생성능 분석 방법

건강한 사람의 PBMC를 5 $\mu\text{g/mL}$ 의 PHA-P (Sigma)와 200 unit/mL의 IL-2 (Roche)로 3일간 활성화 배양하였다. MSC들을 96-well Flat bottom plate (SPL)에 2×10^4 개씩 심어두고, 다음 날 활성화된 PBMC 1×10^5 개를 각각 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 항 CD3 항체 (eBioscience, OKT3)와 항 CD28 항체 (eBioscience, CD28.2)가 코팅된 P815 세포 1×10^5 개와 함께 1시간 배양하였다. 그리고 Golgistop (BD)과 Golgiplug (BD)를 첨가하여 2시간 추가 배양하고 이후 세포들을 수거하여 FACS 완충액으로 1회 세척하였다. 항체의 비특이적인 결합을 막기 위하여 세포의 Fc 수용체를 Fc Receptor Binding Inhibitor Polyclonal Antibody (Invitrogen)와 함께 4°C에서 15분간 인큐베이션하였다. 이후 CD4 T세포는 PerCP-CD3 (BD Bioscience, SK7), 및 APC-CD4 (BD Bioscience, SK3) 마커로, CD8 T세포는 PerCP-CD3 (BD Bioscience, SK7), 및 PE/Cy7-CD8 (BD Bioscience, SK1) 마커와 함께 4°C 암실에서 30분간 인큐베이션하여 표지하였다. 이후 FACS 완충액으로 세포를 2회 세척하고, Fix/Perm buffer (BD Bioscience)로 4°C 암실에서 20분 인큐베이션 한 후 Perm/Wash buffer (BD Bioscience)를 보충하여 2회 세척하였다. 세포 내 사이토카인 검출을 위하여 FITC-IFN γ (BD, 25723.11), PE-TNF α (eBioscience, MAb11)와 함께 4°C 암실에서 12시간 이상 인큐베이션 하고 Perm/Wash buffer로 2회 세척한 뒤, FACS 완충액으로 2회 세척한 후 유동세포계측기로 분석하였다.

9. 동물모델의 Graft-versus-host disease (GvHD) 유도

7주령 수컷 NOD-*scid* IL2Rgamma^{null} (NSG)를 Jackson Laboratory (#005557)로부터 구매한 후 2주간 적응화 시켰다. 그리고 X-RAD 320 x-ray irradiator (Precision X-Ray Inc.)를 사용하여 2.0 Gy로 방사선 조사하고, 다음 날 건강한 사람 유래 PBMC (STEMCELL Technology) 2.5×10^6 개 또는 PBS를 정맥주사 하였다. PBMC 주입 18일차에 5마리씩 나누어 PBS 또는 0.5% FBS가 첨가된 MEM α 또는 empty-MSC, CEACAM1-4L 과발현 MSC, 또는 CEACAM1-4S 과발현 MSC를 각각 5×10^5 개씩 정맥주사 하였고 3일 간격으로 60일간 몸무게를 측정하였다.

10. 동물모델 체내 주입용 MSC 제작

동물모델 체내 주입용 CEACAM1 발현 MSC를 제작하기 위하여 MSC를 Accutase (Innovative Cell Technologies)를 사용하여 배양용기로부터 부드럽게 수거한 후 렌티바이러스 접종 하루 전 날 T25 flak (Corning)에서 배양하였다. 다음날 4 MOI의 CEACAM1 발현용 렌티바이러스를 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 polybrene (Sigma)과 함께 24시간 접종하고, 이후 배양액을 새로운 배양액으로 교체하여 24 시간 추가 배양하였다. 세포를 Accutase로 떼어낸 후 2,000 cells/cm² 규모로 T175 (Thermo) 또는 T75 (Corning) flask에서 5일간 추가 배양하였다. MSC를 DPBS (Gibco)로 2회 세척한 후 2 mM EDTA가 첨가된 Accutase로 37°C에서 5분간 반응시켜 떼어낸 뒤 40 μm strainer에 걸러 수집하였다. 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 세포를 모은 뒤 10% FBS에 첨가된 MEM α 배양액으로 2회 추가 세척하였다. 이 후 MSC들을 0.5% FBS가 첨가된 MEM α 로 풀어 70 μm strainer에 거른 후 5×10^5 cells/200 μl 로 준비하였다.

실시예 1. 줄기세포에서 CEACAM1의 발현 양상 분석

제대-유래 중간엽줄기세포(UC-MSC)를 포함한 정상적인 줄기세포의 경우, 일반적인 상황에서는 CEACAM1을 발현하지 않기 때문에 CEACAM1을 안정적으로 과발현시키기 위하여 상기 '실험 재료 및 방법' 부분에서 서술한 바와 같이 렌티바이러스를 이용하여 발현을 유도하였다. 렌티바이러스의 감염 여부는 GFP로 확인하였고, CEACAM1의 세포 표면 발현은 PE-CEACAM1 항체를 이용하여 확인하였다.

결과는 도 1a 및 도 1b에 나타내었다. 먼저, 빈 벡터를 포함한 렌티바이러스에 의해 감염된 중간엽줄기세포(empty-MSC)에서의 CEACAM1 발현은 음성으로 나타났고, CEACAM1 과발현 MSC에서는 모두 양성 발현이 확인되었다. 동위체별 발현 수준을 비교하면, CEACAM1-4가 CEACAM1-3보다 높았으며, 긴 형태(long form)가 짧은

은 형태 (short form)보다 낮았다 (도 1a). 이러한 경향은 CEACAM1 동위체별 특성이 다를 수 있을 가능성을 제시한다.

[0146] 한편, PE-CEACAM1 항체는 동위체 특이적인 구분을 할 수 없기 때문에, 더욱 면밀하게 동위체 발현을 검증하고자 CEACAM1 mRNA 종류를 역전사 증합효소 연쇄반응으로 분석하였다. 그 결과, 의도적으로 도입한 CEACAM1 동위체들의 정상적인 PCR 반응물 사이즈가 확인되었다 (도 1b). 이러한 결과들은 UC-MSC에 렌티바이러스 매개 CEACAM1 동위체 특이적인 유전자 도입이 가능함을 검증한 것이다.

[0148] 실시예 2. 사이토카인에 따른 PBMC의 CEACAM1 발현 패턴 확인

[0149] PBMC 내의 대표적 면역세포인 NK 세포, NKT(Natural killer T) 세포 및 T 세포에서 CEACAM1의 발현을 조사하기 위해, 상기 '실험 재료 및 방법'의 목차 4에서 서술한 바와 같이 PHA-P를 포함한 IL-12, IL-2, IL-15 그리고 IFN- γ 가 포함된 배지에서 3일간 배양하였다. NK 세포는 $CD56^+CD3^-$ 로, NKT 세포는 $CD56^+CD3^+$, T 세포는 $CD56^-CD3^+$ 로 게이팅 (gating)하여 분석하였고, 활성화 전의 CEACAM1 발현 정도와 함께 비교하였다.

[0150] 그 결과 도 2에서 확인할 수 있는 바와 같이, PHA-P 뿐만 아니라 다양한 사이토카인과 조합이 된 조건에서 CEACAM1 발현이 증가되었는데, PHA+IL-2와 PHA+IL-15 배양 조건에서 CEACAM1 발현이 가장 많이 유도됨을 확인하였다. 각각의 세포별 CEACAM1 발현 양상을 분석한 결과는, 특히 NKT 세포에서의 CEACAM1 발현이 가장 증가되었고, NK 세포 보다는 T 세포의 CEACAM1 발현이 더 높았다. 이러한 경향은 CEACAM1이 면역세포별로 다양한 수준으로 발현되며, 해당 면역세포들의 면역반응 조절에 관여할 수 있음을 시사한다.

[0152] 실시예 3. CEACAM1 과발현 줄기세포의 ENK 세포독성 저항성 확인

[0153] UC-MSC의 CEACAM1 과발현에 의해 NK 세포의 세포독성 활성으로부터 회피될 수 있는지 확인하기 위하여, 상기 서술한 바와 같이 empty-MSC 또는 4종의 CEACAM1 과발현 MSC를 ENK 세포와 함께 2시간 동안 배양하였다.

[0154] 배양액을 통해 세포 용해 정도를 측정한 결과 CEACAM1 과발현 UC-MSC의 생존이 증가하였음을 확인하였다 (도 3a). 이러한 결과는 UC-MSC가 CEACAM1으로 인해 ENK세포에 대한 저항성이 생겼음을 제시한다. 뿐만 아니라, ENK 세포의 탈과립화 활성을 $CD107a$ 발현 정도로 분석한 결과, CEACAM1 과발현 UC-MSC에서 그 발현이 감소되는 것을 확인하였다 (도 3b). 이는 ENK 세포가 UC-MSC의 CEACAM1으로 인해 세포독성 능력이 감소되었음을 의미한다. 상기 결과와 같은 결과는 줄기세포에서 발현되는 CEACAM1이 ENK 세포의 면역반응을 회피하는데 중요한 인자임을 증명한 것이다.

[0156] 실시예 4. CEACAM1 과발현 줄기세포의 말초혈액 단핵세포 (PBMC) 내 NK 세포에 의한 세포독성 저항성 확인

[0157] 상기 '실험 재료 및 방법' 부분에서 서술한 바와 같이, empty-MSC 또는 CEACAM1 과발현 MSC를 2일간 사전-활성화된 PBMC와 함께 4시간 동안 배양하였다.

[0158] 배양액을 통해 세포의 용해 정도를 측정한 결과 CEACAM1 과발현 UC-MSC의 생존이 증가하였음을 확인하였다 (도 4a). 뿐만 아니라, NK 세포의 탈과립화 활성을 $CD107a$ 발현 정도로 분석한 결과, CEACAM1 과발현 UC-MSC에서 그 발현이 감소되는 것을 확인하였다 (도 4b). 이는 NK 세포가 UC-MSC의 CEACAM1으로 인해 세포독성 능력이 감소되었음을 의미한다. 상기 결과와 같은 결과는 MSC에 발현되는 CEACAM1이 NK 세포의 면역반응을 회피하는데 중요한 인자임을 확인한 것이다. 즉, 이러한 결과는 PBMC 내의 NK 세포가 MSC의 세포사멸에 영향력을 미치며, CEACAM1 발현이 이를 회피하는데 중요한 인자임을 시사하는 것이다.

[0160] 실시예 5. CEACAM1 과발현 줄기세포의 NK92 세포주에 의한 세포독성 저항성 확인

[0161] NK92 세포주의 CEACAM1 발현 수준을 확인한 결과 NK 세포를 포함한 다른 정상 면역세포들보다 그 발현 정도가 높았다.

[0162] 상기 '실험 재료 및 방법' 부분에서 서술한 바와 같이 empty-MSC 또는 CEACAM1 과발현 MSC에 대한 세포 독성을 비교한 결과, CEACAM1 과발현 MSC에 대한 세포살상 능력이 감소되었다 (도 5). ENK 세포, 사전-활성화된 PBMC

및 NK92 세포주를 이용한 실험 결과들은 NK 세포의 CEACAM1과 MSC의 CEACAM1의 상호작용이 NK 세포의 MSC 살상 능력을 감소시키는 것을 알 수 있다.

[0164] 실시예 6. CEACAM1 과발현 줄기세포의 CD4 T 세포 및 CD8 T 세포 증식 억제능 확인

[0165] PBMC의 CEACAM1 발현 스크리닝을 통해, 사이토카인 등의 여러 자극에 의해 T 세포에서도 CEACAM1의 발현이 유도되는 것을 확인하였다. CEACAM1 과발현 MSC가 T 세포의 활성을 억제할 수 있는지 여부를 확인하기 위하여, 상기 '실험 재료 및 방법'의 목차 7에서 서술한 바와 같이 PBMC를 CFSE로 표지하고 PHA-P, MSC와 함께 5일간 배양하였다.

[0166] 유동세포계측기로 CD4 T 세포의 증식률을 분석한 결과, PHA-P에 의해 97%가 증식한 반면, empty-MSC와 배양되는 경우 81.75%, CEACAM1 과발현 MSC와 배양되는 경우 평균 74.7%가 증식하였다 (도 6a). 이러한 결과는 empty-MSC에 의해 분열되지 않는 CD4 T 세포의 비율이 15.3%, CEACAM1 과발현 MSC에 의해 분열되지 않는 CD4 T 세포의 비율이 22.3%임을 나타내는 것으로서 CEACAM1이 CD4 T 세포의 분열 억제에 관여한다는 것을 의미한다.

[0167] 한편, CD8 T 세포의 증식률을 분석한 결과, PHA-P에 의해 99.4%가 증식한 반면, empty-MSC와 배양되는 경우 97%, CEACAM1 과발현 MSC와 배양되는 경우 평균 96.1% 증식을 확인하였다 (도 6b). CD8 T 세포의 경우 empty-MSC나 CEACAM1 과발현 MSC가 존재하여도 대부분의 CD8 T 세포는 증식되지만, CFSE 희석 정도를 비교하면 CEACAM1 과발현 MSC의 증식 억제능은 관찰되는 것으로 판단된다. 결국, 이러한 결과는 CEACAM1 과발현 MSC가 CD8 T 세포 보다는 CD4 T 세포 증식 억제에 더 우세한 것을 의미한다.

[0169] 실시예 7. CEACAM1 과발현 줄기세포의 CD4 T 세포 및 CD8 T 세포 증식 억제능 재확인

[0170] Empty-MSC와 CEACAM1 과발현 MSC의 증식 억제 능력을 면밀하게 비교하기 위하여, CD4 T 또는 CD8 T 세포의 CFSE 형광 강도를 비교 분석하였다.

[0171] 먼저, PHA-P에 자극에 의해 CD4 T 또는 CD8 T 세포가 분열하는 동안 CFSE 형광 강도가 감소하였고, empty-MSC에 의해 분열이 억제되어 형광 강도가 증가하였다. CEACAM1 과발현 MSC와 배양된 경우 CD4 T 또는 CD8 T 세포의 CFSE 형광 강도는 empty-MSC와 배양된 경우보다 더 증가하는 것으로 나타났다 (도 7a 및 도 7d). 이러한 결과는 empty-MSC보다 CEACAM1 과발현 MSC가 전반적인 T 세포 증식 억제 능력이 우월함을 의미한다.

[0172] 더욱 면밀한 분석을 위해, MSC에 의한 CD4 T 세포의 분열 횟수와 분열 정도를 측정하였다. 0회차 (미분열) 분열을 분석한 결과, empty-MSC와 배양된 경우 21%, CEACAM1-4L 과발현 MSC와 배양된 경우 32%로 나타났고, 1회차 분열을 분석한 결과 empty-MSC와 배양된 경우 40%, CEACAM1-4L 과발현 MSC와 배양된 경우 53%로 나타났다. 2회차 분열을 분석한 결과 empty-MSC와 배양된 경우 27%, CEACAM1-4L 과발현 MSC와 배양된 경우 13%였다 (도 7b). 이러한 결과는 CEACAM1 과발현 MSC와 배양된 CD4 T 세포 분열이 분열 초기부터 억제되어 있는 것을 의미한다.

[0173] 동일한 방법으로 CD8 T 세포의 분열 횟수와 분열 정도를 측정하였다. 1회차 분열을 분석한 결과, empty-MSC와 배양된 경우 6%, CEACAM1-4L 과발현 MSC와 배양된 경우 14%로 나타났다. 2회차 분열을 분석한 결과, empty-MSC와 배양된 경우 18%, CEACAM1-4L 과발현 MSC와 배양된 경우 43%였다. 3회차 분열을 분석한 결과는 empty-MSC와 배양된 경우 39%, CEACAM1-4L 과발현 MSC와 배양된 경우 34%였다. 4회차 분열을 분석한 결과 empty-MSC와 배양된 경우 29%, CEACAM1-4L 과발현 MSC와 배양된 경우 3%였다 (도 7e). empty-MSC와 배양된 CD8 T 세포가 3회차까지 분열을 하다가 4회차부터 분열이 억제되는 반면, CEACAM1 과발현 MSC와 배양된 CD8 T 세포는 2회차까지 분열을 하다가 3회차부터 분열이 억제되는 것을 알 수 있다. 이러한 결과는 CEACAM1 과발현 MSC가 empty-MSC에 비해 CD8 T 세포의 증식 억제능력이 더 뛰어남을 의미하는 것이다. 다만, T 세포의 활성 지표인 CD25를 분석한 결과 CEACAM1 동소체의 종류에 따른 유의한 차이는 없었다 (도 7c 및 도 7f).

[0175] 실시예 8. CEACAM1 과발현 줄기세포의 T 세포 사이토카인 분비 조절능 확인

[0176] 상기 실시예를 통해 CEACAM1 과발현 줄기세포가 CD4 T 세포 및 CD8 T 세포의 증식을 억제할 수 있음을 확인한 바, CEACAM1 과발현 줄기세포가 상기 T 세포들의 사이토카인 분비능에도 영향을 미치는지 확인하였다. 이를 위해, PHA-P와 IL-2에 의해 3일간 활성화된 PBMC를 MSC, 항CD3 항체, 항CD28 항체가 코팅된 P815세포와 함께 3일간 배양하고, CD4 T 세포 및 CD8 T 세포의 세포 내 IFN γ 및 TNF α 를 형광염색하여 분석하였다.

[0177] 먼저 CEACAM1 과발현 줄기세포와 배양된 CD4 T 세포의 IFN γ 및 TNF α 분비 패턴을 분석한 결과, CEACAM1-4L 과발현 MSC에 의한 사이토카인 분비 억제 효과가 통계적으로 가장 우수하였다. empty-MSC에 의해 CD4 T 세포의 IFN γ 분비가 23.5% 감소된 반면, CEACAM1-4L 과발현 MSC과 배양하였을 때에는 42.8% 감소되었다. 뿐만 아니라 TNF α 의 경우 empty-MSC에 의해 16.4% 감소된 반면, CEACAM1-4L 과발현 MSC에 의해 29.8% 감소되었다 (도 8a). 이어서 CEACAM1 과발현 줄기세포와 배양된 CD8 T 세포의 IFN γ 및 TNF α 분비 패턴을 분석한 결과, empty-MSC에 의해 CD8 T 세포의 IFN γ 분비가 7.78% 감소된 반면, CEACAM1-4L 과발현 MSC에 의해 25.9% 감소되었다. 뿐만 아니라 TNF α 의 경우 empty-MSC에 의해 23.8% 감소된 반면, CEACAM1-4L 과발현 MSC에 의해 46.4% 감소되었다 (도 8b). 이러한 결과는 MSC가 T 세포의 사이토카인 분비를 억제하는 것을 의미하며, 상기 억제능은 CEACAM1-4L 과발현에 의해 더욱 강화됨을 제시한다.

[0179] **실시예 9. CEACAM1 과발현 줄기세포의 이식편대숙주질환 치료효과 확인**

[0180] 상기 실시예들을 통해 CEACAM1-4L 과발현 MSC가 T 세포의 증식뿐만 아니라 이들에 의한 사이토카인 분비를 탁월하게 억제할 수 있음이 *in vitro* 수준에서 확인되었으므로, 나아가 T 세포 매개 질환에도 효과가 있는지 *in vivo* 수준에서도 검증하고자 이식편대숙주질환 (Graft-versus-host disease, GvHD) 모델을 선택하여 *in vivo* 실험을 진행하였다. GvHD 반응은 공여자 T 세포가 수여자의 세포들을 공격하여 나타나는 질환으로 GvHD 발병 시 공여자 T 세포들의 활성을 억제하는 것이 중요하다. 본 발명자들은 마우스 모델에서 GvHD를 유도하기 위하여 9주령 NSG 생쥐에 2.0 Gy 방사선을 조사한 뒤 2.5×10^6 개의 사람 PBMC를 정맥 주사하였다. GvHD 유도 생쥐의 몸무게는 15일차부터 감소되기 시작하였고, CEACAM1 과발현 MSC의 치료효과를 확인하기 위하여 18일차에 vehicle, empty-MSC, CEACAM1-4L 과발현 MSC, CEACAM1-4S 과발현 MSC를 정맥주사로 주입하였다.

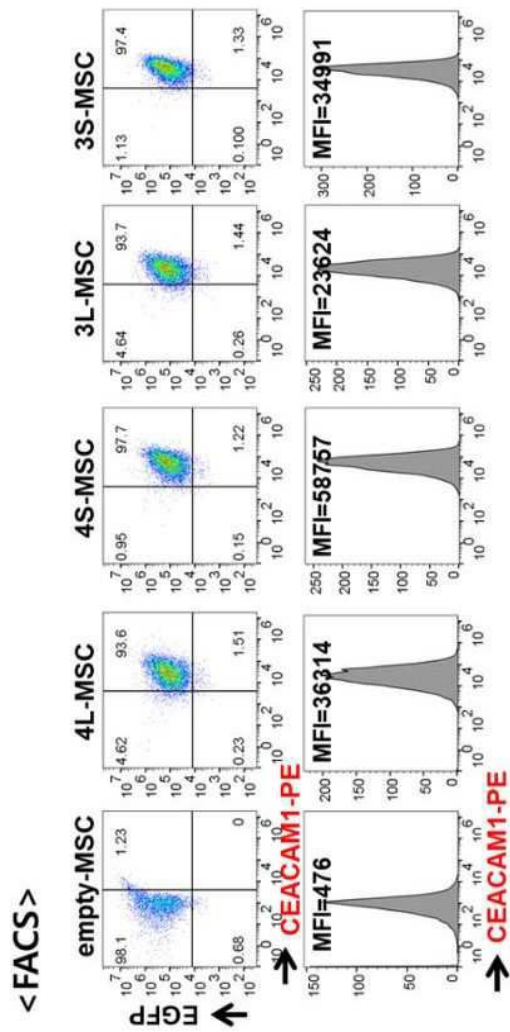
[0181] 몸무게 변화를 관찰한 결과, empty-MSC 주입군의 경우 몸무게가 다시 상승하는 경향을 보였지만, 비 치료 생쥐 (GvHD군)와 비슷한 속도로 몸무게가 감소되었다. 반면 CEACAM1-4L 과발현 MSC 주입군에서 27일 차까지 몸무게가 다시 상승하다가 30일차부터 몸무게가 감소하였는데, 비 치료 생쥐 (GvHD군)보다 완만한 감소 경향을 보였다. CEACAM1-4S 과발현 MSC 주입군에서는 비 치료 생쥐 (GvHD군)와 비슷한 속도로 몸무게가 감소하다가 36일차부터 완만한 속도로 감소되었다 (도 9a). 또한 생존율 분석에서도 CEACAM1-4L 과발현 MSC 주입군에서 비 치료 생쥐 (GvHD군) 대비 유의하게 증가한 생존율 향상을 보였다 (도 9b). 이러한 결과는 *in vitro* 실험과 유사하게 *in vivo* 에서도 CEACAM1-4L 과발현 MSC의 T 세포 활성 조절 능력이 가장 우수하며, CEACAM1-4L 과발현 MSC가 GvHD 치료 효과를 증가시키는 것을 의미한다.

[0183] 이상의 실시예를 통해, 본 발명자들은 CEACAM1 과발현 MSC가 CD4 T 세포 증식의 초기 단계와, CD8 T 세포의 과도한 분열을 효과적으로 억제할 수 있음을 확인하였으며, MSC 생존율 감소를 초래하는 CD4 T 세포 및 CD8 T 세포의 사이토카인 분비를 억제할 수 있음을 확인하였다. 나아가, 이식편대숙주질환 동물모델을 이용한 구체적인 실험을 통해 CEACAM1 과발현 MSC가 실제로 T 세포 매개 염증 질환을 치료할 수 있음을 확인하였다. 따라서 본 발명에 따른 CEACAM1 과발현 MSC는 이식편대숙주질환 등의 면역질환, 천식, 섬유증 등 다양한 염증성 질환, 자가면역질환 등 다양한 면역세포 관련 질환에서 효과적인 세포 치료제로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

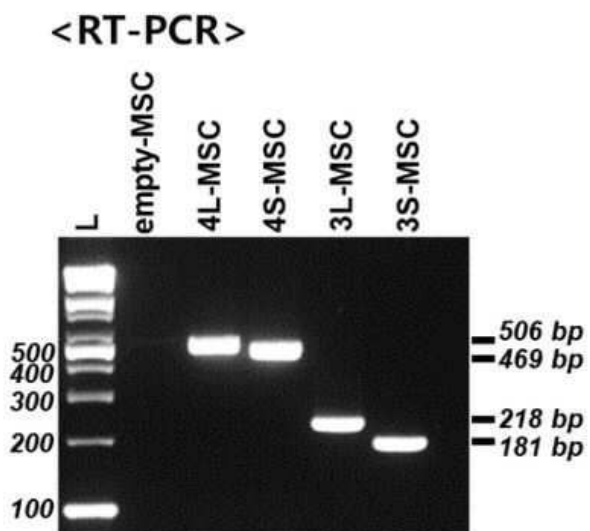
[0185] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

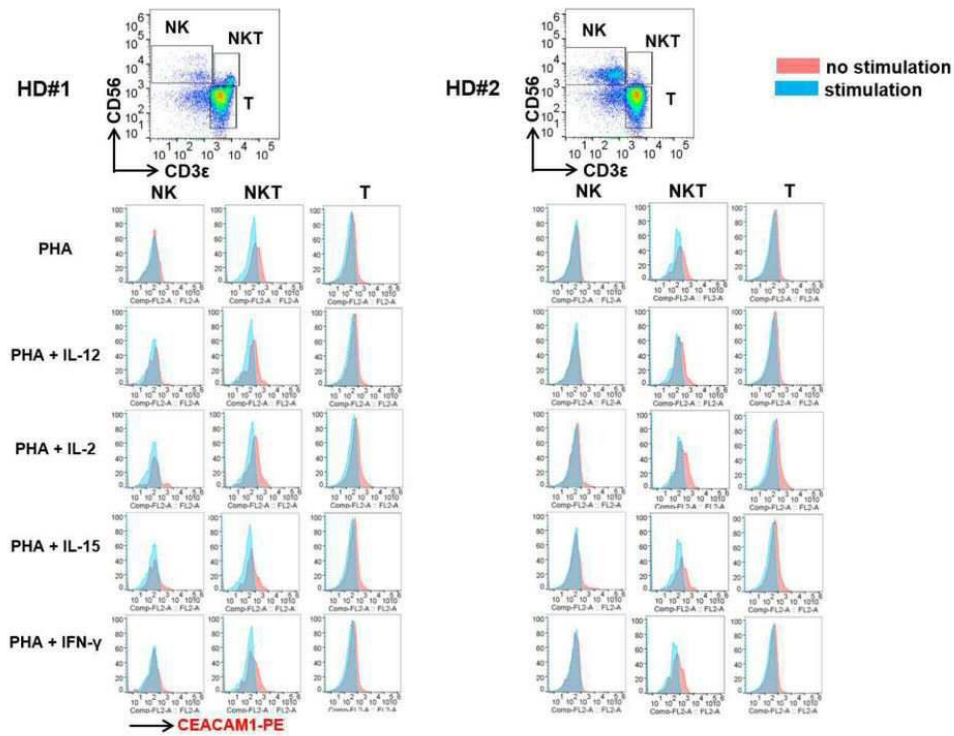
도면1a



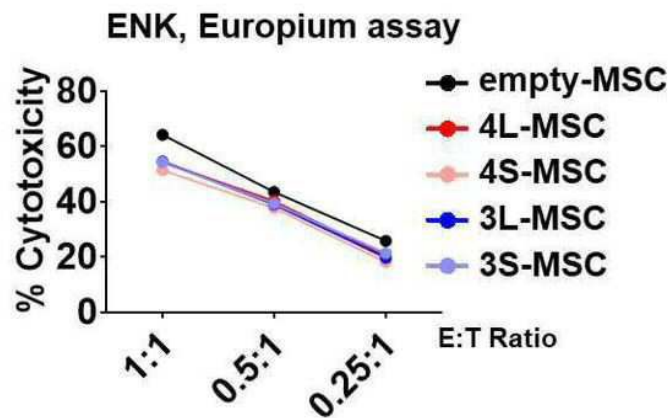
도면1b



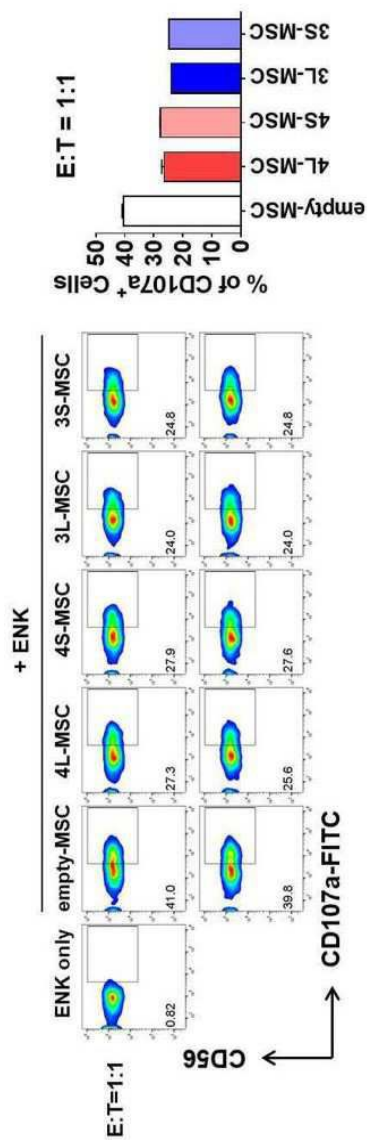
도면2



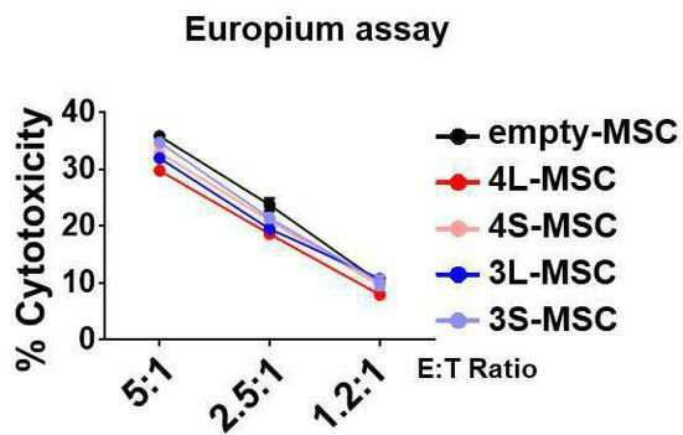
도면3a



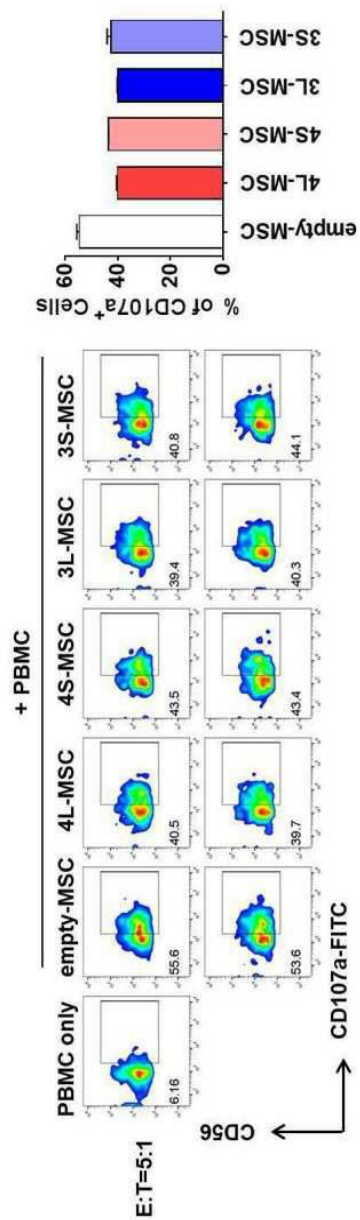
도면3b



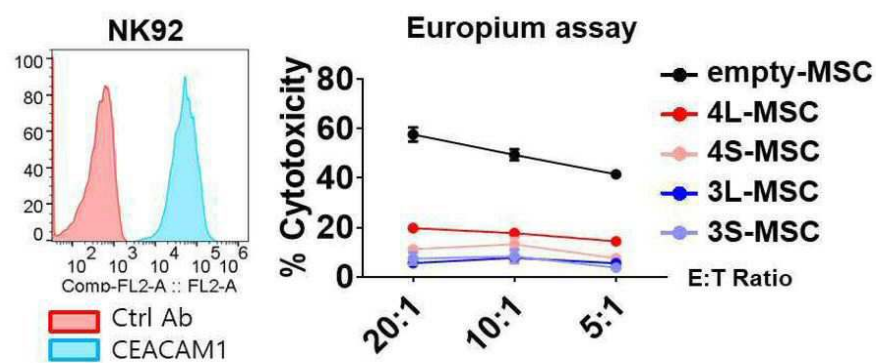
도면4a



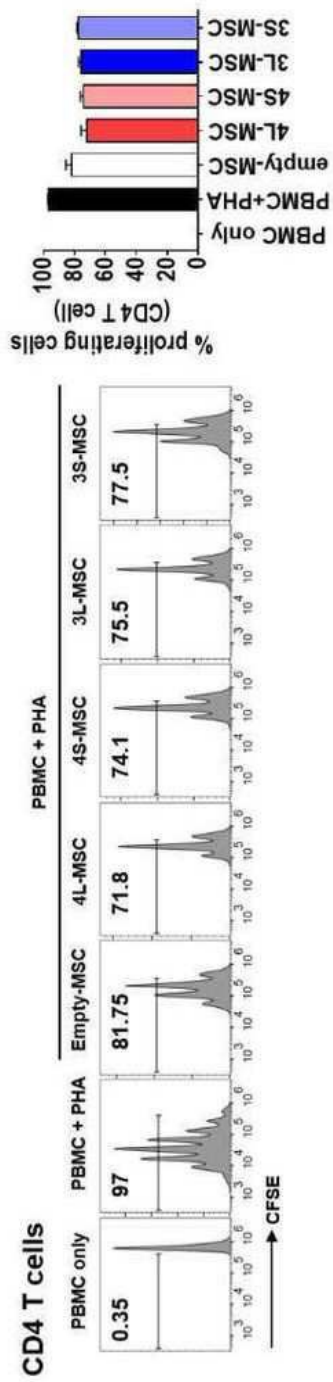
도면4b



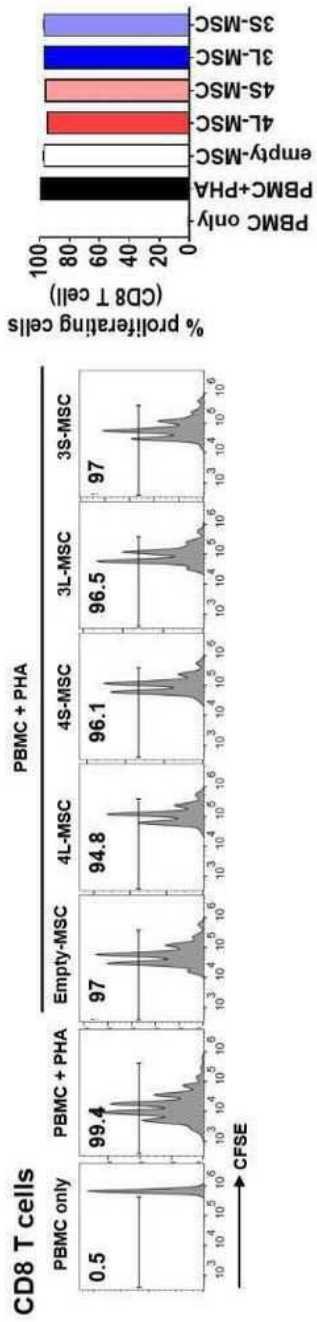
도면5



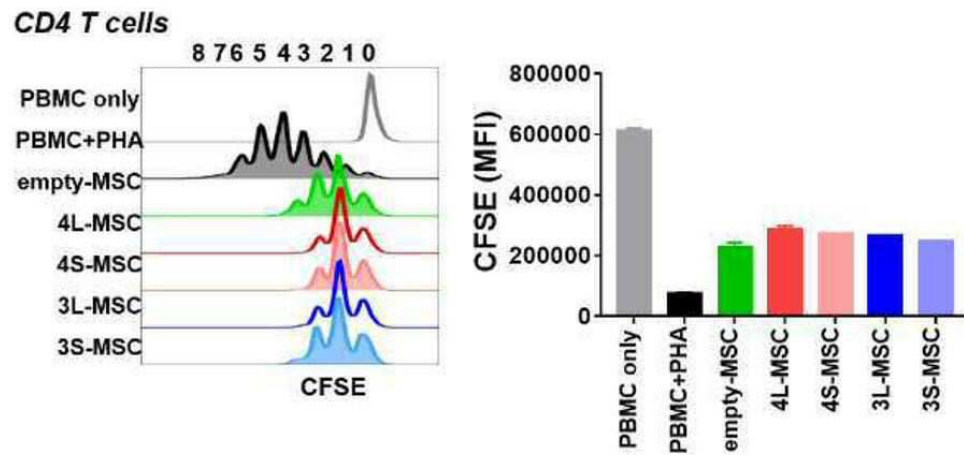
도면6a



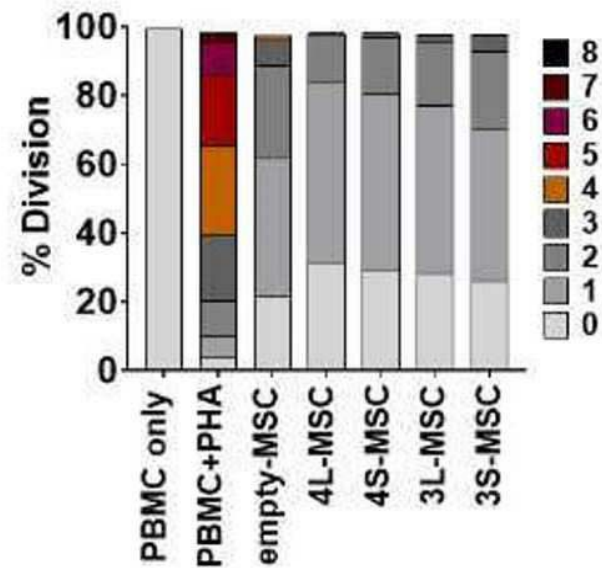
도면6b



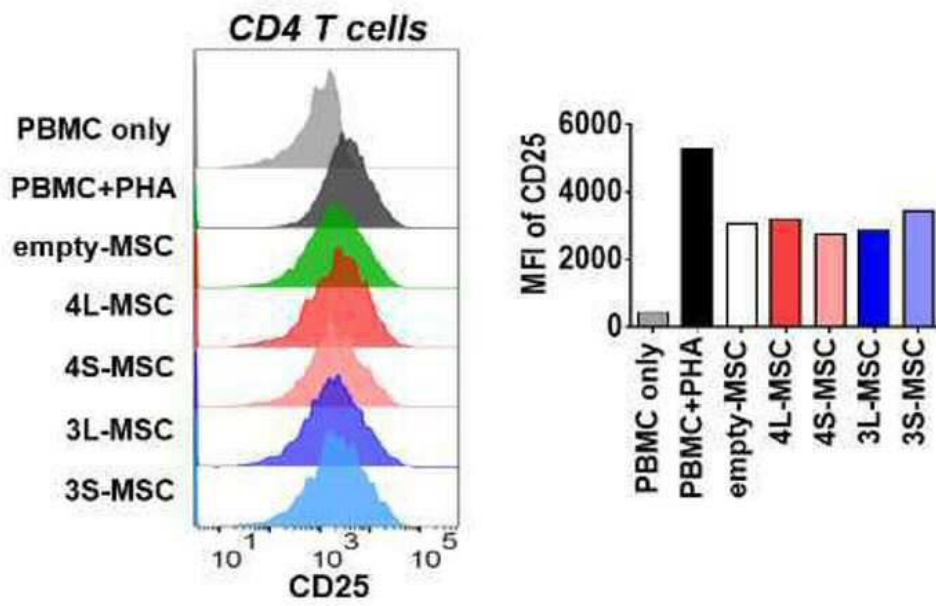
도면7a



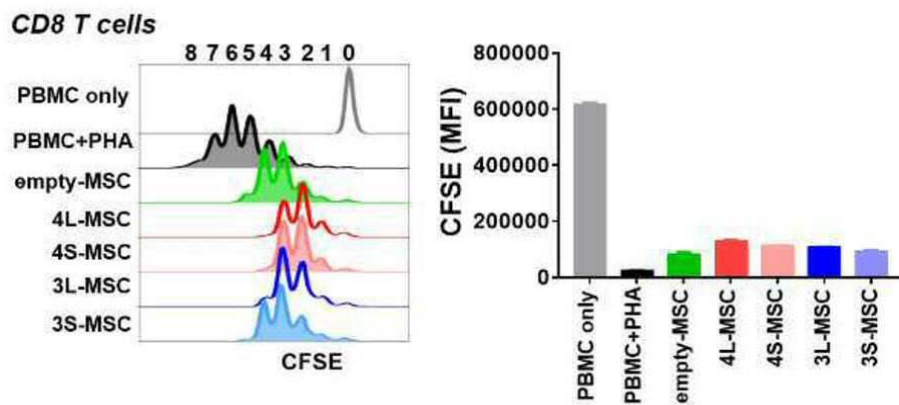
도면7b



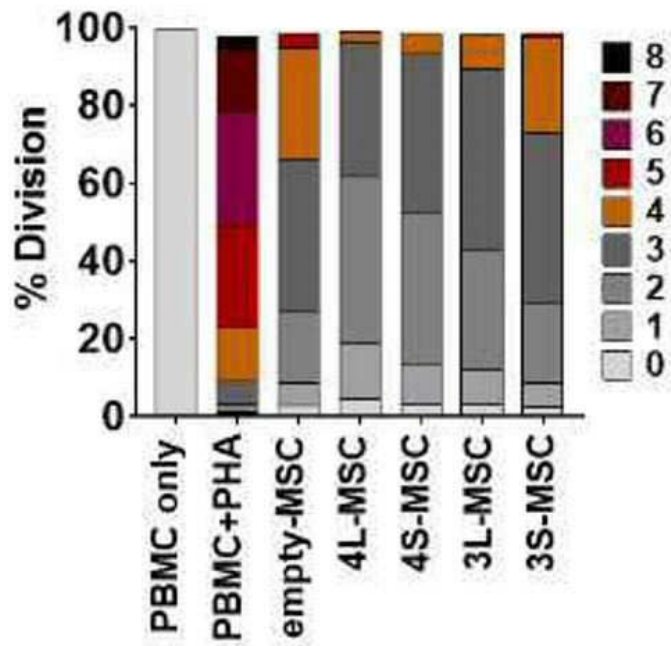
도면7c



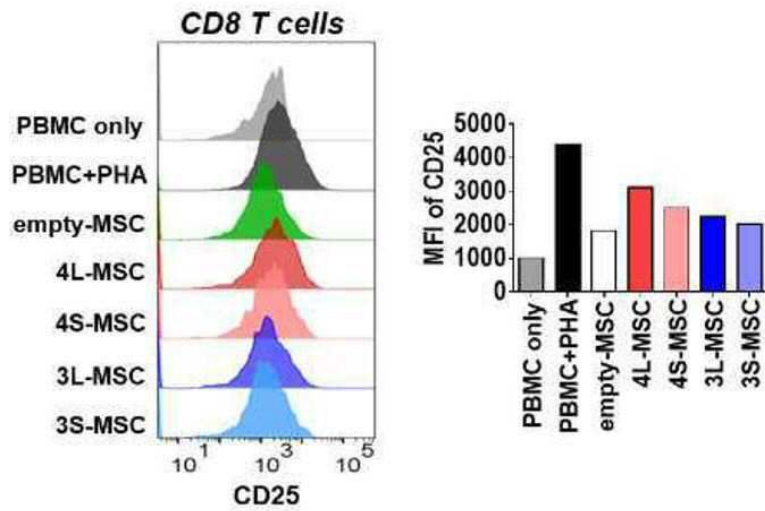
도면7d



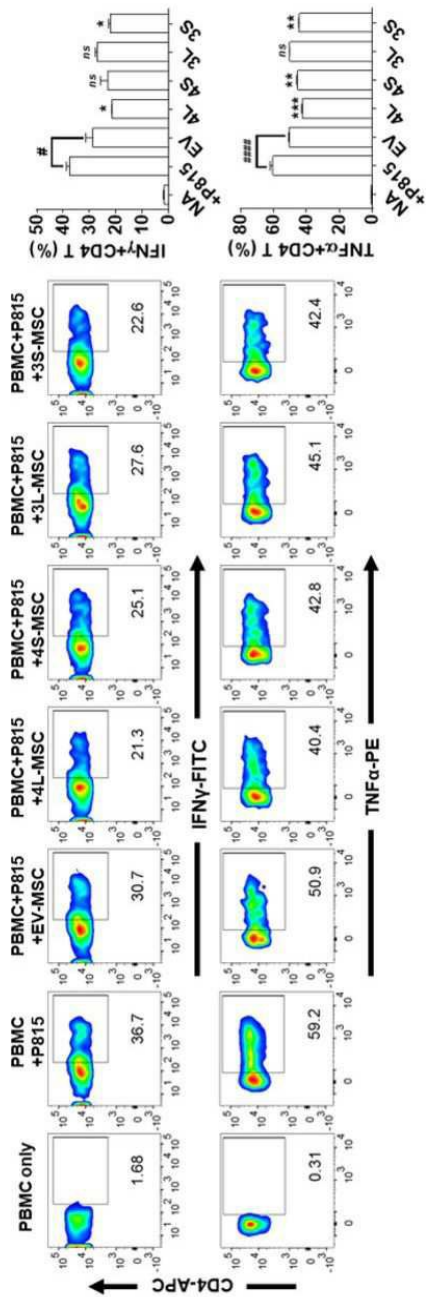
도면7e



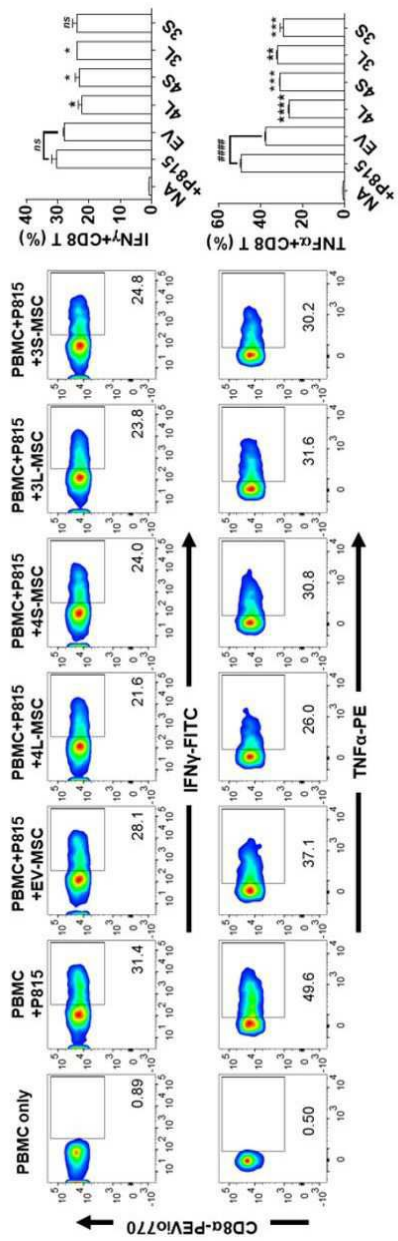
도면7f



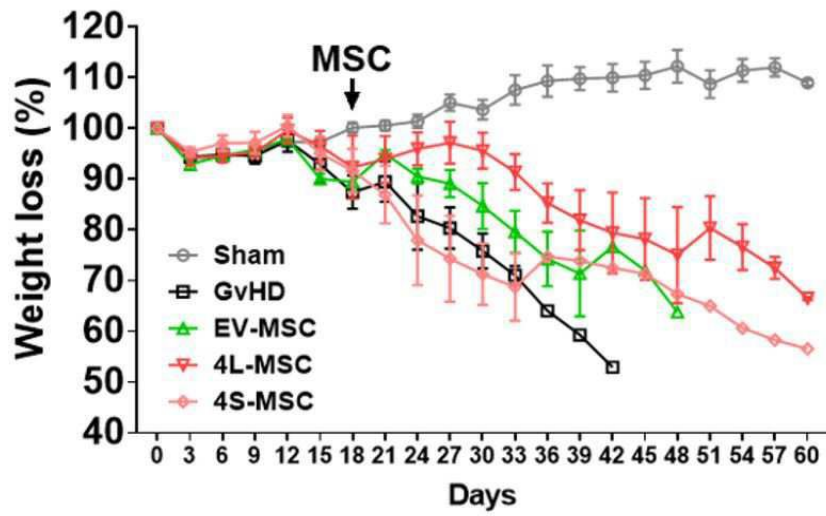
도면8a



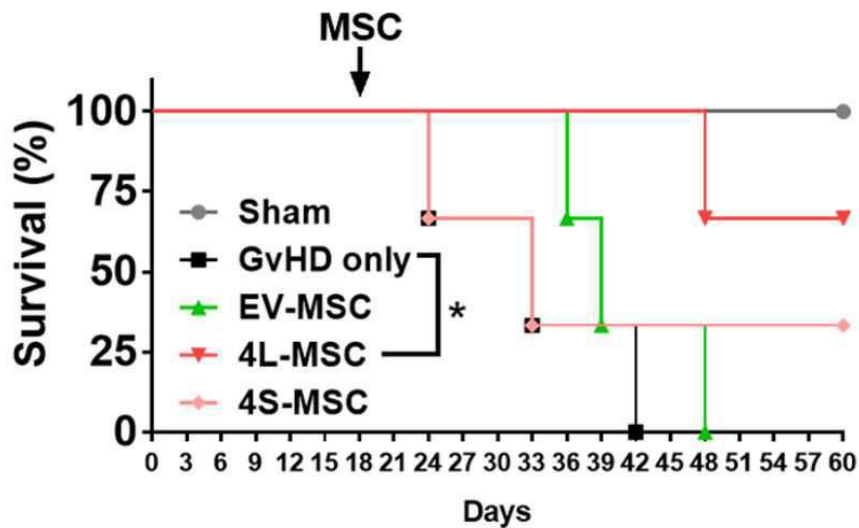
도면8b



도면9a



도면9b



서열 목록

<110> THE ASAN FOUNDATION

University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation

<120> Stem cells overexpressing immune cell tolerance modulators and
uses thereof

<130> MP20-239P1

<150> KR 10-2021-0008386

<151> 2021-01-20

<160> 11

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1
 <211> 1581
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

atggggcacc tctcagcccc acttcacaga gtgcgtgtac cctggcaggg gctttctgctc 60
 acagcctcac ttctaacctt ctggaacccg cccaccactg cccagctcac tactgaatcc 120

atgccattca atgttcgaga ggggaaggag gttctttctcc ttgtccacaa tctgccccag 180
 caactttttg gctacagctg gtacaaaggg gaaagagtgg atggcaaccg tcaaattgta 240
 ggatatgcaa taggaactca acaagctacc ccagggcccg caaacagcgg tcgagagaca 300
 atatacccca atgcatccct gctgatccag aacgtcacc agaatgacac aggattctac 360
 accctacaag tcataaagtc agatcttgtg aatgaagaag caactggaca gttccatgta 420
 taccgggagc tgcccaagcc ctccatctcc agcaacaact ccaacctgt ggaggacaag 480
 gatgctgtgg ccttcacctg tgaacctgag actcaggaca caacctacct gtggtggata 540

aacaatcaga gcctcccggt cagtcccagg ctgcagctgt ccaatggcaa caggaccctc 600
 actctactca gtgtcacaag gaatgacaca ggacctatg agtgtgaaat acagaaccca 660
 gtgagtgcga accgcagtga cccagtcacc ttgaatgtca cctatggccc ggacaccccc 720
 accatttccc cttcagacac ctattaccgt ccaggggcaa acctcagcct ctctgctat 780
 gcagcctcta acccacctgc acagtactcc tggcttatca atggaacatt ccagcaaagc 840
 acacaagagc tcittatccc taacatcact gtgaataata gtggatccta tacctgccac 900
 gccataaact cagtcactgg ctgcaacagg accacagtca agacgatcat agtcactgag 960

ctaagtccag tagtagcaaa gcccacaatc aaagccagca agaccacagt cacaggagat 1020
 aaggactctg tgaacctgac ctgtccaca aatgacactg gaatctccat ccgttggttc 1080
 ttcaaaaacc agagtctccc gtctcggag aggatgaagc tgtcccaggg caacaccacc 1140
 ctcagcataa accctgtcaa gagggaggat gctgggacgt attggtgtga ggtcttcaac 1200
 ccaatcagta agaaccaaa cgaccccatc atgctgaacg taaactataa tgctctacca 1260
 caagaaaatg gcctctcacc tggggccatt gctggcattg tgattggagt agtggccctg 1320
 gttgctctga tagcagtagc cctggcatgt ttcttgcatc tcgggaagac cggcagggca 1380

agcgaccagc gtgatctcac agagcacaaa ccctcagtct ccaaccacac tcaggaccac 1440
 tccaatgacc cacctaaca gatgaatgaa gttacttatt ctaccctgaa ctttgaagcc 1500
 cagcaacca cacaaccaac ttcagcctcc ccctccctaa cagccacaga aataatttat 1560

tcagaagtaa aaaagcagta a

1581

<210> 2

<211> 526

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gly His Leu Ser Ala Pro Leu His Arg Val Arg Val Pro Trp Gln

1 5 10 15

Gly Leu Leu Leu Thr Ala Ser Leu Leu Thr Phe Trp Asn Pro Pro Thr

20 25 30

Thr Ala Gln Leu Thr Thr Glu Ser Met Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly

35 40 45

Lys Glu Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln Gln Leu Phe Gly

50 55 60

Tyr Ser Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Val

65 70 75 80

Gly Tyr Ala Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Asn Ser

85 90 95

Gly Arg Glu Thr Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val

100 105 110

Thr Gln Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu Gln Val Ile Lys Ser Asp

115 120 125

Leu Val Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe His Val Tyr Pro Glu Leu

130 135 140

Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Lys

145 150 155 160

Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Thr Thr Tyr

165 170 175

Leu Trp Trp Ile Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln

180 185 190

Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr Arg Asn

195 200 205

Asp Thr Gly Pro Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Val Ser Ala Asn
 210 215 220
 Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Thr Tyr Gly Pro Asp Thr Pro

 225 230 235 240
 Thr Ile Ser Pro Ser Asp Thr Tyr Tyr Arg Pro Gly Ala Asn Leu Ser
 245 250 255
 Leu Ser Cys Tyr Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Leu
 260 265 270
 Ile Asn Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn
 275 280 285
 Ile Thr Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Thr Cys His Ala Asn Asn Ser
 290 295 300

 Val Thr Gly Cys Asn Arg Thr Thr Val Lys Thr Ile Ile Val Thr Glu
 305 310 315 320
 Leu Ser Pro Val Val Ala Lys Pro Gln Ile Lys Ala Ser Lys Thr Thr
 325 330 335
 Val Thr Gly Asp Lys Asp Ser Val Asn Leu Thr Cys Ser Thr Asn Asp
 340 345 350
 Thr Gly Ile Ser Ile Arg Trp Phe Phe Lys Asn Gln Ser Leu Pro Ser
 355 360 365
 Ser Glu Arg Met Lys Leu Ser Gln Gly Asn Thr Thr Leu Ser Ile Asn

 370 375 380
 Pro Val Lys Arg Glu Asp Ala Gly Thr Tyr Trp Cys Glu Val Phe Asn
 385 390 395 400
 Pro Ile Ser Lys Asn Gln Ser Asp Pro Ile Met Leu Asn Val Asn Tyr
 405 410 415
 Asn Ala Leu Pro Gln Glu Asn Gly Leu Ser Pro Gly Ala Ile Ala Gly
 420 425 430
 Ile Val Ile Gly Val Val Ala Leu Val Ala Leu Ile Ala Val Ala Leu
 435 440 445

 Ala Cys Phe Leu His Phe Gly Lys Thr Gly Arg Ala Ser Asp Gln Arg

450 455 460
 Asp Leu Thr Glu His Lys Pro Ser Val Ser Asn His Thr Gln Asp His
 465 470 475 480
 Ser Asn Asp Pro Pro Asn Lys Met Asn Glu Val Thr Tyr Ser Thr Leu
 485 490 495
 Asn Phe Glu Ala Gln Gln Pro Thr Gln Pro Thr Ser Ala Ser Pro Ser
 500 505 510
 Leu Thr Ala Thr Glu Ile Ile Tyr Ser Glu Val Lys Lys Gln

515 520 525
 <210> 3
 <211> 1395
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 3
 atggggcacc ttcagcccc acttcacaga gtgcgtgtac cctggcaggg gcttctgctc 60
 acagcctcac ttctaacctt ctggaacccg cccaccactg cccagctcac tactgaatcc 120
 atgccattca atgttgcaaga ggggaaggag gttcttctcc ttgtccacaa tctgccccag 180
 caactttttg gctacagctg gtacaaaggg gaaagagtgg atggcaaccg tcaaattgta 240
 ggatatgcaa taggaactca acaagctacc ccagggcccg caaacagcgg tcgagagaca 300

 atatacccca atgcatccct gctgatccag aacgtcacc agaatgacac aggattctac 360
 accctacaag tcataaagtc agatcttgtg aatgaagaag caactggaca gttccatgta 420
 taccggagc tgcccaagcc ctccatctcc agcaacaact ccaaccctgt ggaggacaag 480
 gatgctgtgg ccttcacctg tgaacctgag actcaggaca caacctacct gtggtggata 540
 aacaatcaga gcctcccggt cagtccagg ctgcagctgt ccaatggcaa caggaccctc 600
 actctactca gtgtcacaag gaatgacaca ggaccctatg agtgtgaaat acagaacca 660
 gtgagtgcca accgcagtga ccagtcacc ttgaatgtca cctatggccc ggacaccccc 720

 accatttccc cttcagacac ctattaccgt ccaggggcaa acctcagcct ctctgctat 780
 gcagcctcta accacactgc acagtactcc tggcttatca atggaacatt ccagcaaagc 840
 acacaagagc tcittatccc taacatcact gtgaataata gtggatccta tacctgccac 900
 gccataaact cagtactgg ctgcaacagg accacagtca agacgatcat agtcactgag 960
 ctaagtccag tagtagcaaa gcccacaatc aaagccagca agaccacagt cacaggagat 1020
 aaggactctg tgaacctgac ctgctccaca aatgacactg gaatctccat ccgttggttc 1080

ttcaaaaacc agagtctccc gtcctcggag aggatgaagc tgtcccaggg caacaccacc 1140

ctcagcataa accctgtcaa gagggaggat gctgggacgt attggtgtga ggtcttcaac 1200

ccaatcagta agaaccaaaag cgaccccatc atgctgaacg taaactataa tgctctacca 1260

caagaaaatg gcctctcacc tggggccatt gctggcattg tgattggagt agtggccctg 1320

gttgctctga tagcagtagc cctggcatgt tttctgcatt tcgggaagac cggcagctca 1380

ggaccactcc aatga 1395

<210> 4

<211> 464

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Gly His Leu Ser Ala Pro Leu His Arg Val Arg Val Pro Trp Gln

1	5	10	15
Gly	Leu	Leu	Leu
Thr	Ala	Ser	Leu
Leu	Leu	Thr	Phe
Trp	Asn	Pro	Pro
Thr			
20	25	30	
Thr	Ala	Gln	Leu
Thr	Glu	Ser	Met
Pro	Phe	Asn	Val
Ala	Glu	Gly	
35	40	45	
Lys	Glu	Val	Leu
Leu	Leu	Val	His
Asn	Leu	Pro	Gln
Gln	Leu	Phe	Gly
50	55	60	
Tyr	Ser	Trp	Tyr
Lys	Gly	Glu	Arg
Val	Asp	Gly	Asn
Arg	Gln	Ile	Val
65	70	75	80

Gly	Tyr	Ala	Ile	Gly	Thr	Gln	Gln	Ala	Thr	Pro	Gly	Pro	Ala	Asn	Ser
85	90	95													
Gly	Arg	Glu	Thr	Ile	Tyr	Pro	Asn	Ala	Ser	Leu	Leu	Ile	Gln	Asn	Val
100	105	110													
Thr	Gln	Asn	Asp	Thr	Gly	Phe	Tyr	Thr	Leu	Gln	Val	Ile	Lys	Ser	Asp
115	120	125													
Leu	Val	Asn	Glu	Glu	Ala	Thr	Gly	Gln	Phe	His	Val	Tyr	Pro	Glu	Leu
130	135	140													
Pro	Lys	Pro	Ser	Ile	Ser	Ser	Asn	Asn	Ser	Asn	Pro	Val	Glu	Asp	Lys

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Thr Thr Tyr
 165 170 175
 Leu Trp Trp Ile Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln
 180 185 190
 Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr Arg Asn
 195 200 205
 Asp Thr Gly Pro Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Val Ser Ala Asn
 210 215 220

 Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Thr Tyr Gly Pro Asp Thr Pro
 225 230 235 240
 Thr Ile Ser Pro Ser Asp Thr Tyr Tyr Arg Pro Gly Ala Asn Leu Ser
 245 250 255
 Leu Ser Cys Tyr Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Leu
 260 265 270
 Ile Asn Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn
 275 280 285
 Ile Thr Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Thr Cys His Ala Asn Asn Ser

 290 295 300
 Val Thr Gly Cys Asn Arg Thr Thr Val Lys Thr Ile Ile Val Thr Glu
 305 310 315 320
 Leu Ser Pro Val Val Ala Lys Pro Gln Ile Lys Ala Ser Lys Thr Thr
 325 330 335
 Val Thr Gly Asp Lys Asp Ser Val Asn Leu Thr Cys Ser Thr Asn Asp
 340 345 350
 Thr Gly Ile Ser Ile Arg Trp Phe Phe Lys Asn Gln Ser Leu Pro Ser
 355 360 365

 Ser Glu Arg Met Lys Leu Ser Gln Gly Asn Thr Thr Leu Ser Ile Asn
 370 375 380
 Pro Val Lys Arg Glu Asp Ala Gly Thr Tyr Trp Cys Glu Val Phe Asn
 385 390 395 400
 Pro Ile Ser Lys Asn Gln Ser Asp Pro Ile Met Leu Asn Val Asn Tyr
 405 410 415

Asn Ala Leu Pro Gln Glu Asn Gly Leu Ser Pro Gly Ala Ile Ala Gly

420

425

430

Ile Val Ile Gly Val Val Ala Leu Val Ala Leu Ile Ala Val Ala Leu

435

440

445

Ala Cys Phe Leu His Phe Gly Lys Thr Gly Ser Ser Gly Pro Leu Gln

450

455

460

<210> 5

<211> 1293

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

atggggcacc ttcagcccc acttcacaga gtgcgtgtac cctggcaggg gcttctgctc 60

acagcctcac ttctaactt ctggaacccg ccaccactg ccagctcac tactgaatcc 120

atgccattca atgttcaga ggggaaggag gttcttctcc ttgtccacaa tctgccccag 180

caactttttg gctacagctg gtacaaaggg gaaagagtgg atggcaaccg tcaaattgta 240

ggatatgcaa taggaactca acaagctacc ccagggcccg caaacagcgg tcgagagaca 300

atatacccca atgcatccct gctgatccag aacgtcacc agaatgacac aggattctac 360

accctacaag tcataaagtc agatcttgtg aatgaagaag caactggaca gttccatgta 420

taccggagc tgcccaagcc ctccatctcc agcaacaact ccaaccctgt ggaggacaag 480

gatgctgtgg ccttcacctg tgaacctgag actcaggaca caacctacct gtggtggata 540

aacaatcaga gcctcccggt cagtccagg ctgcagctgt ccaatggcaa caggaccctc 600

actctactca gtgtcacaag gaatgacaca ggaccctatg agtgtgaaat acagaacca 660

gtgagtgcga accgcagtga ccagtcacc ttgaatgtca cctatggccc ggacaccccc 720

accatttccc cttcagacac ctattaccgt ccaggggcaa acctcagcct ctctgctat 780

gcagcctcta accacactgc acagtactcc tggcttatca atggaacatt ccagcaaagc 840

acacaagagc tctttatccc taacatcact gtgaataata gtggatccta tacctgccac 900

gccaataact cagtcaactgg ctgcaacagg accacagtca agacgatcat agtcactgat 960

aatgctctac cacaagaaaa tggcctctca cctggggcca ttgctggcat tgtgattgga 1020

gtagtggccc tggttgctct gatagcagta gcctggcat gttttctgca tttcggaag 1080

accggcaggg caagcgacca gcgtgatctc acagagcaca aacctcagt ctccaaccac 1140

actcaggacc actccaatga ccacctaac aagatgaatg aagttactta ttctaccctg 1200

aactttgaag cccagcaacc cacacaacca acttcagcct ccccatccct aacagccaca 1260
gaaataattt attcagaagt aaaaaagcag taa 1293

<210> 6
<211> 430
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 6

Met Gly His Leu Ser Ala Pro Leu His Arg Val Arg Val Pro Trp Gln
1 5 10 15

Gly Leu Leu Leu Thr Ala Ser Leu Leu Thr Phe Trp Asn Pro Pro Thr
20 25 30

Thr Ala Gln Leu Thr Thr Glu Ser Met Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly
35 40 45

Lys Glu Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln Gln Leu Phe Gly
50 55 60

Tyr Ser Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Val
65 70 75 80

Gly Tyr Ala Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Asn Ser
85 90 95

Gly Arg Glu Thr Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val
100 105 110

Thr Gln Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu Gln Val Ile Lys Ser Asp
115 120 125

Leu Val Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe His Val Tyr Pro Glu Leu
130 135 140

Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Lys
145 150 155 160

Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Thr Thr Tyr
165 170 175

Leu Trp Trp Ile Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln
180 185 190

Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr Arg Asn

195 200 205
 Asp Thr Gly Pro Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Val Ser Ala Asn
 210 215 220
 Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Thr Tyr Gly Pro Asp Thr Pro

 225 230 235 240
 Thr Ile Ser Pro Ser Asp Thr Tyr Tyr Arg Pro Gly Ala Asn Leu Ser
 245 250 255
 Leu Ser Cys Tyr Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Leu
 260 265 270
 Ile Asn Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn
 275 280 285
 Ile Thr Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Thr Cys His Ala Asn Asn Ser
 290 295 300

 Val Thr Gly Cys Asn Arg Thr Thr Val Lys Thr Ile Ile Val Thr Asp
 305 310 315 320
 Asn Ala Leu Pro Gln Glu Asn Gly Leu Ser Pro Gly Ala Ile Ala Gly
 325 330 335
 Ile Val Ile Gly Val Val Ala Leu Val Ala Leu Ile Ala Val Ala Leu
 340 345 350
 Ala Cys Phe Leu His Phe Gly Lys Thr Gly Arg Ala Ser Asp Gln Arg
 355 360 365
 Asp Leu Thr Glu His Lys Pro Ser Val Ser Asn His Thr Gln Asp His

 370 375 380
 Ser Asn Asp Pro Pro Asn Lys Met Asn Glu Val Thr Tyr Ser Thr Leu
 385 390 395 400
 Asn Phe Glu Ala Gln Gln Pro Thr Gln Pro Thr Ser Ala Ser Pro Ser
 405 410 415
 Leu Thr Ala Thr Glu Ile Ile Tyr Ser Glu Val Lys Lys Gln
 420 425 430

 <210> 7
 <211> 1107
 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

atggggcacc tctcagcccc acttcacaga gtgcgtgtac cctggcaggg gcttctgctc 60

acagcctcac ttctaacttt ctggaacccg cccaccactg cccagctcac tactgaatcc 120

atgccattca atgttgca ggggaaggag gttcttctcc ttgtccacaa tctgccccag 180

caactttttg gctacagctg gtacaaaggg gaaagagtgg atggcaaccg tcaaattgta 240

ggatatgcaa taggaactca acaagctacc ccagggcccc caaacagcgg tcgagagaca 300

atatacccca atgcatccct gctgatccag aacgtcacc agaatgacac aggattctac 360

accctacaag tcataaagtc agatcttggt aatgaagaag caactggaca gttccatgta 420

taccgggagc tgcccaagcc ctccatctcc agcaacaact ccaaccctgt ggaggacaag 480

gatgctgtgg ccttcacctg tgaacctgag actcaggaca caacctacct gtggtggata 540

aacaatcaga gcctcccggt cagtcaccag ctgcagctgt ccaatggcaa caggaccctc 600

actctactca gtgtcacaag gaatgacaca ggaccctatg agtgtgaaat acagaaccca 660

gtgagtgcga accgcagtga cccagtcacc ttgaatgtca cctatggccc ggacaccccc 720

accatttccc cticagacac ctattaccgt ccaggggcaa acctcagcct ctctgctat 780

gcagcctcta acccacctgc acagtactcc tggcttatca atggaacatt ccagcaaagc 840

acacaagagc tctttatccc taacatcact gtgaataata gtggatccta tacctgccac 900

gccataaact cagtcactgg ctgcaacagg accacagtca agacgatcat agtcactgat 960

aatgctctac cacaagaaaa tggcctctca cctggggcca ttgctggcat tgtgattgga 1020

gtagtggccc tggttgctct gatagcagta gcctggcat gttttctgca tttcggaag 1080

accggcagct caggaccact ccaatga 1107

<210> 8

<211> 368

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Gly His Leu Ser Ala Pro Leu His Arg Val Arg Val Pro Trp Gln

1 5 10 15

Gly Leu Leu Leu Thr Ala Ser Leu Leu Thr Phe Trp Asn Pro Pro Thr

20 25 30

Thr Ala Gln Leu Thr Thr Glu Ser Met Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly

35 40 45
 Lys Glu Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln Gln Leu Phe Gly
 50 55 60
 Tyr Ser Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Val
 65 70 75 80
 Gly Tyr Ala Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Asn Ser

 85 90 95
 Gly Arg Glu Thr Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val
 100 105 110
 Thr Gln Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu Gln Val Ile Lys Ser Asp
 115 120 125
 Leu Val Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe His Val Tyr Pro Glu Leu
 130 135 140
 Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Lys
 145 150 155 160

 Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Thr Thr Tyr
 165 170 175
 Leu Trp Trp Ile Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln
 180 185 190
 Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr Arg Asn
 195 200 205
 Asp Thr Gly Pro Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Val Ser Ala Asn
 210 215 220
 Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Thr Tyr Gly Pro Asp Thr Pro

 225 230 235 240
 Thr Ile Ser Pro Ser Asp Thr Tyr Tyr Arg Pro Gly Ala Asn Leu Ser
 245 250 255
 Leu Ser Cys Tyr Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Leu
 260 265 270
 Ile Asn Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn
 275 280 285
 Ile Thr Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Thr Cys His Ala Asn Asn Ser

290 295 300

Val Thr Gly Cys Asn Arg Thr Thr Val Lys Thr Ile Ile Val Thr Asp

305 310 315 320

Asn Ala Leu Pro Gln Glu Asn Gly Leu Ser Pro Gly Ala Ile Ala Gly

325 330 335

Ile Val Ile Gly Val Val Ala Leu Val Ala Leu Ile Ala Val Ala Leu

340 345 350

Ala Cys Phe Leu His Phe Gly Lys Thr Gly Ser Ser Gly Pro Leu Gln

355 360 365

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer of CEACAM1

<400> 9

gcaacaggac cacagtcaag acga 24

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer of CEACAM1-3L and -4L

<400> 10

gtggttggag actgagggtt tg 22

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer of CEACAM1-3S and -4S

<400> 11

tggagtggtc ctgagctgcc g 21