



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0053871
(43) 공개일자 2018년05월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 39/39 (2006.01) A61K 31/719 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 39/39 (2013.01)

A61K 31/719 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-0150959

(22) 출원일자 2016년11월14일

심사청구일자 2016년11월14일

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 신선로 365 (용당동,
부경대학교)

(72) 발명자

오정환

부산광역시 남구 분포로 111, 106동 1006호(LG 메트로시티)

곽민석

부산광역시 남구 분포로 113, 228동 104호(LG 메트로시티)

진준오

부산광역시 남구 분포로 111, 139동 202호(LG메트로시티)

(74) 대리인

위병갑

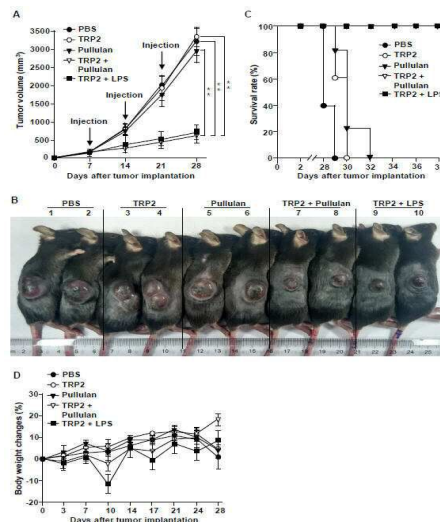
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 폴룰란을 유효성분으로 포함하는 애주번트 조성물

(57) 요약

본 발명은 폴룰란(pullulan)을 유효성분으로 포함하는 애주번트(adjutant) 조성물 및 상기 애주번트 조성물과 표적 항원을 유효성분으로 포함하는 백신 조성물에 관한 것으로서, 구체적으로 상기 폴룰란은 비장 및 림프절에서의 수지상세포의 성숙을 유도하고, 성숙된 수지상세포에 의하여 Th1 세포 중재의 면역반응 및 CTL 활성을 증가시키며, 폴룰란 및 표적 항원을 함께 처리하는 경우 항원-특이적인 면역반응을 유도하여 암의 예방 또는 치료뿐만 아니라 암의 재발 또는 전이를 억제하는데 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

A61K 39/0011 (2013.01)

A61K 2039/55583 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1525005408

부처명 해양수산부

연구관리전문기관 한국해양과학기술진흥원

연구사업명 해양수산생명공학기술개발사업

연구과제명 (핵심과제1) 해양융복합 바이오닉스 진단기기 개발

기 여 율 1/2

주관기관 부경대학교 산학협력단

연구기간 2016.01.01 ~ 2016.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2014R1A1A2059063

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공분야 기초연구사업

연구과제명 구형단백질의 모델이 되는 나노입자 라이브러리와 표면 물성에 따른 세포상호작용

기 여 율 1/2

주관기관 부경대학교 산학협력단

연구기간 2014.11.01 ~ 2017.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

풀룰란(pullulan)을 유효성분으로 포함하는 애주번트(adjuvant) 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 풀룰란은 흑효모(*Aureobasidium pullulans*) 유래의 다당류인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 풀룰란은 비장 및 림프절에서의 수지상세포(dendritic cell; DC)의 성숙을 유도하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 풀룰란은 Th1 세포 증재의 면역반응을 촉진시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 풀룰란은 CTL(Cytotoxic T Lymphocytes)의 활성을 증가시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 풀룰란은 종양을 가진 동물에서 수지상세포의 성숙에 의하여 면역반응의 활성을 유도하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제 1 항의 애주번트 조성물 및 표적 항원을 유효성분으로 포함하는 백신 조성물.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

상기 항원은 단백질, 재조합 단백질, 당단백질, 펩타이드, 다당류, 펩타이드 또는 폴리뉴클레오티드인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

제 7 항에 있어서,

상기 항원은 세포, 박테리아 또는 바이러스인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

제 7 항에 있어서,

상기 항원은 종양에 특이적인 항원인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 11

제 7 항에 있어서,

상기 백신 조성물은 상기 표적 항원에 특이적인 항체의 생성을 유도하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 12

제 7 항에 있어서,

상기 백신 조성물은 상기 표적 항원에 특이적인 CTL(Cytotoxic T Lymphocytes)의 활성을 유도하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 13

제 7 항의 백신 조성물을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 14

제 7 항의 백신 조성물을 유효성분으로 포함하는 암의 재발 또는 전이 억제용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 폴롤란을 유효성분으로 포함하는 애주번트 조성물 및 상기 조성물과 표적 항원을 포함하는 백신 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 종양면역요법은 종양세포의 사멸을 유도하는 면역 반응을 유도하는 것이다(Finn OJ. The New England Journal of Medicine. 2008; 358(25):2704-2715). 효과적인 종양세포 사멸을 위해서는 T 세포 및 B 세포 면역반응을 유도해야 하며, 특히, 종양 항원에 대항하는 CTL(cytotoxic T lymphocyte) 활성 및 항원 특이적인 항체 생산이 중요하다(Banchereau J and Palucka AK. Nature Reviews Immunology. 2005; 5(4):296-306). 그러나, 종양 항원은 T 세포 및 B 세포 활성에 대한 면역성이 거의 없고, 이는 DC(dendritic cell) 및 대식세포와 같은 항원제시세포가 MHC 분자로 적은 양의 종양 항원을 제시하고, 적은 양의 공동-활성 분자를 발현하기 때문이다 (Smith ME et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1989; 86(14):5557-5561; 및 Jager D, Jager E and Knuth A. Journal of Clinical Pathology. 2001; 54(9):669-674). 따라서, 종양 면역을 향상시키기 위해서는 DC 성숙을 유도할 수 있는 애주번트가 T 세포 및 B 세포 활성을 위하여 종양 항원과 함께 요구된다(Banchereau J and Palucka AK. Nature Reviews Immunology. 2005; 5(4):296-306).

[0003] DC는 T 세포 및 B 세포 면역에 중요한 조절인자이다. 자극원이나 항원에 노출되면, 미성숙의 DC는 성숙화 과정을 거쳐 비장 및 림프절(LN; lymph node)로 이동하고 T 세포 활성을 유도하고(Banchereau J and Palucka AK. Nature Reviews Immunology. 2005; 5(4):296-306; 및 Banchereau J and Steinman RM. Nature. 1998; 392(6673):245-252), 성숙된 DC는 특정 타입의 effector T 세포 및 CTL로 유도되도록 결정하게 하는 전-염증성 사이토카인을 생산하는 것으로 알려져 있다(Moser M and Murphy KM. Nature Immunology. 2000; 1(3):199-205; 및 Pooley JL, Heath WR and Shortman K. Journal of Immunology. 2001; 166(9):5327-5330). 다른 DC 서브셋은 다른 역할을 하는데, 마우스 비장 DC 중 소수 군인 CD8⁺ cDC (conventional DC)는 내재적 합성된 단백질을 교차-제시(cross-presentation)하는 능력이 있고, 마우스 비장 DC 의 주요 군인 CD8⁺ cDC는 세포 외 항원을 CD4 T 세포로 직접 제시하는 선택적 능력이 있다(Pooley JL, Heath WR and Shortman K. Journal of immunology. 2001; 166(9):5327-5330; Jin JO, Zhang W, Du JY, Wong KW, Oda T and Yu Q. PloS one. 2014; 9(6):e99396; Schnorrer P et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2006; 103(28):10729-10734; 및 Watts C. Nature Immunology. 2004; 5(7):685-692). 종양 백신은 종양세포의 사멸 활성을 위해 종양 항원에 특이적인 CTL 활성을 유도해야 하므로, CD8⁺ DC-중재의 종양 항원

에 대한 교차-제시가 매우 중요하며, Th 세포 반응이 없는 곳에서의 제한된 CTL 활성이므로, 성숙된 CD8 α^+ DC에 의해 유도된 CD4 T 세포 활성이 요구된다(Schoenberger SP, Toes RE, van der Voort EI, Offringa R and Melief CJ. Nature. 1998; 393(6684):480-483).

[0004] 면역 애주번트 또는 면역항원보강제는 항원에 대항하여 면역 활성을 유도하는 것으로서, 천연의 다당류, 박테리아 산물 및 사이토카인의 일부가 알려져 있다(Afonso LC et al., Science. 1994; 263(5144):235-237; McSorley SJ, Ehst BD, Yu Y and Gewirtz AT. Journal of Immunology. 2002; 169(7):3914-3919; Luo M et al., Scientific reports. 2015; 5:11062; 및 Zhang W, Cho SY, Xiang G, Min KJ, Yu Q and Jin JO. PloS One. 2015; 10(6):e0130926). 해조류 다당류의 애주번트 기능은 타겟된 종양 면역성을 유도함으로써 종양 면역요법에 중요할 것으로 보여진다(Luo M et al., Scientific Reports. 2015; 5:11062).

[0005] 풀룰란은 효모상균(yeast-like fungus)인 흑효모(*Aureobasidium pullulans*) 유래의 다당류로서, 주로 말토트리오스 단위가 α -1,6 글리코시드결합으로 이루어진 α -글루칸으로 알려져 있다(Bender H, Lehmann J and Wallenfels K. Biochimica et biophysica acta. 1959; 36:309-316; 및 Uchida T, Ikegami H, Ando S, Kurimoto M, Mitsuhashi M, Naito S, Usui M and Matuhasi T. International archives of allergy and immunology. 1993; 102(3):276-278). 기존 연구에서는 인간 전혈배양에서 풀룰란이 IL-1 β , IL-6, IL-8 및 TNF- α 을 포함하는 전-염증성 사이토카인의 생산을 유도한다는 것을 증명한 바 있다(Noss I, Doekes G, Thorne PS, Heederik DJ and Wouters IM. Innate immunity. 2013; 19(1):10-19). 더욱이, 물에서 자기조립에 의하여 물리적으로 교차결합된 나노젤을 형성하는 CHP(cholesteryl-group-bearing pullulan)는 약물-전달 시스템에서 캐리어로서 사용되었다는 보고가 있고(Nomura Y, Ikeda M, Yamaguchi N, Aoyama Y and Akiyoshi K. FEBS letters. 2003; 553(3):271-276; Kageyama S et al., Cancer science. 2008; 99(3):601-607; Uenaka A et al., Cancer immunity. 2007; 7:9; 및 Nagatomo D et al., BioMed research international. 2015; 2015:471468), 추가된 애주번트 없이 CHP 의해 전달된 항원 단백질은 코의 면역 시스템을 촉진하였고, 비강 내의 백신 활성을 나타냈다는 보고도 있다(Nochi T et al., Nature materials. 2010; 9(7):572-578). 그러나, *in vivo* 종양 환경에서 항암 면역반응을 위한 애주번트로서 사용될 수 있다는 효과는 조사되지 않았다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 1. 한국공개특허 제10-2016-0099780호

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) 1. Uchida T et al., Int Arch Allergy Immunol. 1993;102(3):276-8.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 풀룰란을 유효성분으로 포함하는 애주번트(adjuvant) 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 애주번트 조성물 및 표적 항원을 유효성분으로 포함하는 백신 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 풀룰란(pullulan)을 유효성분으로 포함하는 애주번트(adjuvant) 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 풀룰란은 흑효모(*Aureobasidium pullulans*) 유래의 다당류인 것일 수 있다.

[0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 풀룰란은 비장 및 림프절에서의 수지상세포(dendritic cell; DC)의 성숙을

유도하는 것일 수 있다.

- [0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 풀물란은 Th1 세포 중재의 면역반응을 촉진시키는 것일 수 있다.
- [0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 풀물란은 CTL(Cytotoxic T Lymphocytes)의 활성을 증가시키는 것일 수 있다.
- [0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 풀물란은 종양을 가진 동물에서 수지상세포의 성숙에 의하여 면역반응의 활성을 유도하는 것일 수 있다.
- [0018] 또한, 본 발명은 상기 애췌번트 조성물 및 표적 항원을 유효성분으로 포함하는 백신 조성물을 제공한다.
- [0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 항원은 단백질, 재조합 단백질, 당단백질, 펩타이드, 다당류, 펩타이드 또는 폴리뉴클레오티드인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 않는다. 예를 들어, 마우스의 경우 마우스에 특이적인 OVA(ovalbumin)을 항원으로서 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 항원은 세포, 박테리아 또는 바이러스인 것일 수 있다.
- [0021] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 항원은 종양에 특이적인 항원인 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 항원은 종양에 특이적인 항원으로서, 체내에서 항원에 대한 면역반응을 촉진함으로써, 추후 항원을 발현하는 암 세포가 발생하였을 때 암세포의 성장을 저해할 수 있어 암으로 예방 또는 치료할 수 있다.
- [0022] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 백신 조성물은 상기 표적 항원에 특이적인 항체의 생성을 유도하는 것일 수 있다.
- [0023] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 백신 조성물은 상기 표적 항원에 특이적인 CTL(Cytotoxic T Lymphocytes)의 활성을 유도하는 것일 수 있다.
- [0025] 또한, 본 발명은 상기 백신 조성물을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0026] 또한, 본 발명은 상기 백신 조성물을 유효성분으로 포함하는 암의 재발 또는 전이 억제용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0027] 본 발명은 백신 및 약학적으로 허용되는 비히클, 부형제 또는 담체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 적합한 비히클은, 예를 들어, 물, 염수, 텍스트로스, 글리세롤, 에탄올 등 및 이들의 조합물이다. 또한, 비히클은 습윤제 또는 에멀전화제, pH 완충제, 또는 애췌번트와 같은 그 밖의 부형제를 함유할 수 있다. 약학적으로 허용되는 담체는 본 발명의 약학적 조성물의 흡수 또는 제거율에 작용하는, 예컨대 안정화시키거나, 증가 또는 감소시키는 생리학적으로 허용되는 화합물을 함유할 수 있다. 생리학적으로 허용되는 화합물은, 예컨대 탄수화물, 예컨대 글루코스, 수크로스, 또는 텍스트란, 항산화제, 예컨대 아스코르브산 또는 글루타티온, 킬레이팅제, 저분자량 단백질, 세척제, 리포솜 담체, 또는 그 밖의 안정화제 및/또는 완충제를 포함할 수 있다. 부형제는 비이온성 계면활성제, 폴리비닐피롤리돈, 인간 혈청 알부민, 알루미늄 하이드록사이드, 마취 작용제, 및 다양한 변형되지 않고 유도체화된 사이클로텍스트린일 수 있다. 보다 바람직하게는, 비이온성 계면활성제는 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 40, 폴리소르베이트 60, 및 폴리소르베이트 80을 포함할 수 있다. 폴리비닐피롤리돈은 바람직하게는 약제 등급의 폴리비닐피롤리돈인 플라스돈(Plasdone) C15일 수 있다.
- [0028] 마취 작용제는 바람직하게는 벤질 알콜이다. 그 밖의 생리학적으로 허용되는 화합물은 습윤제, 에멀전화제, 분산제 또는 보존제를 포함한다. 본 발명의 약학적 조성물은 보조 물질, 예컨대 약리학적 작용제, 사이토카인, 또는 그 밖의 생물학적 반응 개질제를 포함할 수 있다. 그러한 부형제 또는 담체를 포함하는 약학적 조성물은 널리 공지된 통상적인 방법에 의해 제형화된다.
- [0029] 본 발명에 따른 백신은 하기 투여 경로용으로 제형화될 수 있다: 근내, 피내, 경구, 경피, 비강, 구강, 직장, 질, 흡입에 의해, 또는 피하 투여에 의해. 만족스러운 면역원성이 유도될 수 있는 한 다른 투여 방식도 적용될 수 있다.
- [0030] 본 발명의 약학적 조성물은 액체 용액 또는 현탁액으로서, 또는 주입 전에 액체 비히클에 용해 또는 현탁되기에 적합한 고체 형태로서, 주사가가능하게 제조될 수 있다. 약학적 조성물은 또한 에멀전화된 고체 형태 또는 지속적인 전달에 사용하기 위해 리포솜 비히클 또는 다른 미립자 담체에 캡슐화된 활성 성분으로 제조될 수 있다. 예

를 들어, 약학적 조성물은 오일 에멀전, 유중수 에멀전, 수중유중수 에멀전, 부위-특이적 에멀전, 장기-체류에 멀전, 점착성 에멀전, 마이크로에멀전, 나노에멀전, 리포솜, 미세입자, 미세구체, 나노구체, 나노입자 및 다양한 천연 또는 합성 중합체, 예컨대 재흡수불가능한 불침투성 중합체, 예컨대 에틸렌비닐 아세테이트 공중합체 및 Hytrel® 공중합체, 팽윤성 중합체, 예컨대 하이드로겔, 또는 재흡수가능한 중합체, 예컨대 콜라겐 및 특정 폴리산 또는 폴리에스테르, 예컨대 백신의 지속적인 방출을 가능케 하는, 재흡수가능한 봉합을 하는데 이용되는 것들의 형태일 수 있다.

[0031] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 암은 유방암, 폐암, 식도암, 직장암, 담도암, 간암, 협착암, 위암, 결장암, 인두암, 신장/콩팥암, 뇌 종양, 전립선암, 난소암, 자궁경부암, 자궁내막암, 췌장암, 고환암, 방광암, 두경부암, 구강암, 신경내분비암, 부신피질암, 갑상샘암, 골암 및 피부암(예컨대, 기저 세포 암종, 편평 세포 암종 또는 흑색종)으로부터 선택되는 어느 하나인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0032] 본 발명에서, 백신의 유효량은 표적 항원에 대하여 IgG 생성을 자극하는 것과 같이 면역학적 효과를 유도할 수 있는 양이다. 백신의 유효량 또는 용량은 표적 항원의 양, 애주번트의 유형, 투여 방식 및 치료되는 피검체의 연령, 크기 및 조건에 따라 달라질 수 있다.

[0033] 백신은 수 개월 내지 수 년 간의 장기 면역 보호 효과를 달성하기 위해, 특정 시간 간격으로 1회 이상의 추가 용량과 함께 또는 없이 일정한(stat) 용량으로 투여될 수 있다. 투여 빈도는 증상의 중증도, 요망되는 면역보호의 정도, 약학적 조성물이 예방용 또는 치료용으로 사용되었는지 여부 등과 같은 임의의 다양한 인자에 의존적 일 수 있다. 예를 들어, 한 구체예에서, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 매월 1회, 매월 2회, 매월 3회, 격주(qow), 매주 1회(qw), 매주 2회(biw), 매주 3회(tiw), 매주 4회, 매주 5회, 매주 6회, 격일(qod), 매일(qd), 하루에 2회(qid), 또는 하루에 3회(tid) 투여된다. 백신은 또한 화학요법, 표적 요법 또는 암 치료용 종양 관련 탄수화물 항원을 표적화하는 항체와 같은 그 밖의 통상적인 요법과 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다.

발명의 효과

[0035] 본 발명에 따른 폴롤란은 종양을 가진 동물에서 비장 및 림프절에서의 수지상세포의 성숙을 유도하고, 성숙된 수지상세포에 의하여 Th1 세포 증개의 면역반응 및 CTL 활성을 증가시킴으로써 애주번트로서 이용할 수 있고, 상기 애주번트 및 종양 특이적인 항원을 함께 투여하여 면역화를 유도할 수 있는 백신으로 이용하여 상기의 면역반응을 유도하여 암의 예방 또는 치료뿐만 아니라 암의 재발 또는 전이를 억제하는데 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0037] 도 1은 폴롤란에 의한 BMDC 및 비장 DC의 활성 유도에 대한 결과를 나타낸 것이다. (A)는 현미경에 의한 형태적 변화를 관찰한 것이고, (B)는 C57BL/6 마우스에 24시간 동안 5, 25 및 50 mg/kg 폴롤란 또는 30 µg LPS를 처리한 후, CD11c⁺ 세포에서 표면 공동-촉진 분자의 발현에 대한 결과이며, (C)는 lineage⁻CD11c⁺ cDC의 퍼센트를 유세포분석기에 의해 분석한 것이고, (D)는 살아있는 lineage⁻CD11c⁺ 세포의 절대적인 수를 나타낸 것이며, (E)는 CD40, CD80, CD86, MHC class I 및 MHC class II의 발현량을 유세포분석기로 측정된 결과이다(*p < 0.05).

도 2는 폴롤란에 의한 DC에서의 전-염증성 사이토카인의 유도 결과를 나타낸 것이다. (A)는 BMDC에서 IL-6, IL-12p40 및 TNF-α의 mRNA 발현량을 5 µg/ml 폴롤란 및 LPS의 처리 후 2시간 뒤에 측정된 결과이고, (B)는 배양 상층액에서 IL-6, IL-12p70 및 TNF-α의 분비량은 5 µg/ml 폴롤란 및 LPS의 처리 후 24시간 뒤에 측정된 결과이며, (C)는 비장세포에서 사이토카인 mRNA 발현량을 25 mg/kg 폴롤란 및 LPS의 처리 후 2시간 뒤에 측정된 결과이고, (D)는 폴롤란 또는 LPS-처리된 마우스로부터의 혈청에서 사이토카인 농도를 측정된 결과이며, (E)세포 내 사이토카인의 생산량은 비장 DC에서 측정된 결과이다(*p < 0.05, **p < 0.01).

도 3은 폴롤란에 의하여 *in vivo* 에서 IFN-γ-생산 CD4 및 CD8 세포의 촉진 결과를 나타낸 것이다. (A)는 비장에서의 CD4 및 CD8 세포에서 IFN-γ, IL-4 및 IL-17-생산 세포의 퍼센트를 유세포분석에 의해 분석한 결과이며, (B)는 C57BL/6 마우스의 혈청에서 IFN-γ 생산량을 ELISA로 측정된 결과이고, (C)는 폴롤란 주입 후 24시간 뒤에 비장에서의 IFN-γ, IL-4, IL-17A, T-bet, GATA3 및 RORγt에 대한 mRNA 발현량을 측정된 결과이다(**p <

0.01).

도 4는 *in vivo* 에서 폴롤란에 의한 항원 제시 및 항원-특이적 T 세포 증식의 촉진 결과에 대한 것이다. (A)는 C57BL/6 마우스에 24시간 동안 PBS, OVA 및 OVA-폴롤란의 조합을 주입한 후, 상기 마우스의 비장세포에서 Lineage⁻CD11c⁺CD8 α ⁺ 및 Lineage⁻CD11c⁺CD8 α ⁻ cDC 에서의 MHC class I 및 II의 발현량을 분석한 결과를 나타낸 것이고, (B)는 OT-I 마우스에서의 CD9 T 세포 또는 OT-II 마우스에서의 CD4 세포의 증식을 CFSE 회석에 의해 결정된 결과를 나타낸 것이며, (C)는 OVA 또는 폴롤란의 처리 후 21일 후에 OVA-특이적 비장 CD8 T 세포의 활성을 tetramer 염색에 의하여 *ex vivo* 에서 분석된 결과(왼쪽 패널)와 CD8 T 세포에서 tetramer 양성 세포의 평균 퍼센트를 나타낸 결과(오른쪽 패널)이며, (D)는 SIINFEKL-특이적인 IFN- γ -생산 세포를 ELISPOT 어세이로 분석한 결과이다.

도 5는 종양을 가진 마우스에서 폴롤란의 주입 후 DC의 성숙 및 항원 특이적 T 세포 면역반응의 유도 결과를 나타낸 것이다. (A)는 비장 및 종양 drLN에서 lineage⁻CD11c⁺ 세포의 퍼센트를 유세포분석기로 분석한 것이고, (B)는 비장(왼쪽 패널) 및 종양 drLN(오른쪽 패널)에서 살아있는 세포 내에 lineage⁻CD11c⁺ 세포의 절대적인 수를 나타낸 것이며, (C)는 유세포분석기에 의한 비장 및 종양 drLN에서의 Lineage⁻CD8 α ⁺CD11c⁺ 및 Lineage⁻CD8 α ⁻CD11c⁺ 세포에서의 MHC class I 및 II 발현을 분석한 결과이고, (D)는 OT-I 및 OT-II 세포의 증식을 CFSE 회석에 의해 분석한 결과이며, (E)는 종양에서 OT-I (왼쪽 패널) 및 OT-II (오른쪽 패널) 세포의 절대적인 수를 나타낸 것이다(***p* < 0.01).

도 6은 *in vivo* 에서 OVA-폴롤란의 조합의 처리에 의한 B16-OVA 종양세포 성장의 억제 효과를 나타낸 것이다. (A)는 마우스에서의 B16-OVA 종양 성장곡선을 나타낸 것이고, (B)는 마우스의 생존율을 나타낸 것이며, (C)는 마우스에서의 종양 덩어리를 보여주는 결과이고, (D)는 종양 형성 후 마우스의 몸무게를 측정한 결과이며, (E)는 CTL(Cytotoxic T lymphocyte) 활성을 측정한 것으로서, SIINFEK-주입된 CFSE⁺ 세포 및 비-펩타이드-주입된 CMTMR⁺ 세포의 퍼센트(왼쪽 패널)와 평균적인 항원-특이적 분해의 퍼센트(오른쪽 패널)를 나타낸 것이다(***p* < 0.01).

도 7은 폴롤란-OVA 조합에 의한 간으로의 B16-OVA 흑색종 세포의 전이 억제 효과를 나타낸 결과이다. (A)는 마우스의 생존율을 나타내는 것이고, (B)는 종양 주입 후 10일째에 비장에서의 종양 덩어리의 크기 및 간으로의 B16-OVA 세포의 전이를 나타낸 것이며, (C)는 간으로의 B16-OVA 전이의 절대적 수의 평균 값을 나타낸 것이고, (D)는 비장(왼쪽 패널) 및 간(오른쪽 패널)의 무게를 나타낸 것이다(***p* < 0.01).

도 8은 *in vivo* 에서 TRP2-폴롤란의 조합에 의한 B16 종양 성장의 억제 효과에 관한 결과이다. (A)는 마우스의 B16 종양 성장곡선을 나타낸 것이고, (B)는 마우스에서의 종양 덩어리를 나타낸 것이며, (C)는 마우스의 생존율을 나타낸 것이고, (D)는 마우스의 몸무게를 나타낸 것이다(***P* < 0.01).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0038] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0040] 실시예 1. 실험재료 및 방법

[0041] 1.1. 마우스 및 세포주

[0042] C57BL/6 마우스(6주령), OT-I 및 OT-II TCR 형질전환(trangenic)된 마우스, 및 C57BL/6-Ly5.1 (CD45.1) 컨지닉(congenic) 마우스는 Shanghai Public Health Clinical Center(Shanghai, CN)로부터 구입하였고, 병원균없는 환경에서 유지되었다. 모든 실험은 Shanghai Public Health Clinical Center에 있는 실험동물운영위원회(Institutional Animal Care and Use committee)의 가이드라인에 따라 수행되었다. 프로토콜은 Shanghai Public Health Clinical Center의 동물실험 윤리위원회에 의해 승인되었다(Mouse Protocol Number: SYXK-2010-0098). 마우스는 CO₂ 흡입 안락사되었고, 고통을 최소화하도록 노력하였다. OVA(ovalbumin)를 발현하는 B16F10(murine melanoma cell line; CRL-6475, ATCC)은 10% FCS를 포함하는 RPMI 1640(Sigma Aldrich)을 사용하여 배양되었다(2 mM glutamine, 1 M HEPES, 100 μ g/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin, 및 2 mM 2-

mercaptoethanol). 모든 세포주는 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양되었다.

1.2. 화학 물질

Aureobasidium pullulans 유래의 풀룰란(pullulan) 및 닭 OVA(ovalbumin)은 Sigma-Aldrich에서 구입하였다. 풀룰란 용액은 내독소(endotoxin)-제거 컬럼(Detoxi-gel: Thermo Fisher Scientific)을 통과시켰고, 순차적으로 내독소-제거 필터(Zetapor Dispo: Wako)를 통과시켰다. 풀룰란은 마우스에 처리하기 전에 새로 준비되었다. OVA 257-264 (SIINFEKL: 서열번호 1)과 TRP2 펩타이드(SVYDFVWL: 서열번호 2)는 Synpeptide (Shanghai)에서 구입되었다.

1.3. 항체

Isotype control Abs(antibodies) (IgG1, IgG2a or IgG2b), CD11c (HL3), CD4 (GK1.5), CD8 α (YTS169.4), CD40 (3/23), CD80 (16-10A1), CD86 (GL-1), anti-IL-4 (11B11), anti-IL-6 (MP5-20F3) 및 anti-IL-12/23p40 (C17.8)은 BioLegend에서 구입되었고; anti-MHC class I (AF6-88.5.3), anti-MHC class II (M5/114.15.2), anti-IFN-γ (XMG1.2), anti-IL-17 (TCC11-18H10.1) and anti-TNF-α (MP6-XT22)은 eBioscience에서 구입되었다.

1.4. 유세포분석

세포는 0.5% BSA를 포함하는 PBS(phosphate buffered saline)에서 세척되었고, 레이블되지 않은 isotype control Abs로 15분 동안 전처리된 후, 30분 동안 얼음통에서 fluorescence-conjugated Abs에 의해 레이블되고 PBS로 세척되었다. 세포는 FACS Aria II (Becton Dickinson)와 FlowJo 8.6 software (Tree Star)로 분석되었다. 세포의 잔해는 포워드 및 사이드-스캐터 게이팅에 의한 분석에서 제외되었다. 또한, 죽은 세포는 7AAD (7 aminoactinomycin D; BioLegend) 염색과 7AAD-negative population에 대한 게이팅에 의해 제외되었다. 비-특이적인 염색을 위한 대조군으로서, isotype-matched irrelevant mAbs가 사용되었다.

1.5. *In vitro* BMDC(Bone Marrow-derived Dendritic Cells) 생성

초기 세포배양은 기존에 기재된 바와 같이 준비되었다(Zhang W, Du JY, Jiang Z, Okimura T, Oda T, Yu Q and Jin JO. Marine Drugs. 2014; 12(7):4148-4164; 및 Zhang W, Cho SY, Xiang G, Min KJ, Yu Q and Jin JO. PloS one. 2015; 10(6):e0130926). 골수 유핵세포(bone marrow nucleated cells; 1×10^6 cells/mL)는 6 well plate에 5ml의 10% FBS가 포함된 modified RPMI 1640 배지를 넣고 배양되었고, 50 ng/ml rmGM-CSF와 50 ng/mL rmIL-4은 BMDCs의 생성을 위하여 배지에 추가되었다. 다른 언급이 없다면, 세포는 37℃, 10% CO₂ 배양기에서 6 일 동안 배양되었다. 배양된 세포는 추가 실험을 수행하기 전에 새로운 배지에서 두 번 세척되었다.

1.6. DC(dendritic cell) 분석

비장(spleen)과 종양 drLN(tumor draining lymph node; 림프절)의 DCs(dendritic cells)가 기존에 보고된 바와 같이 분석되었다(Jin JO, Zhang W, Du JY, Wong KW, Oda T and Yu Q. PloS One. 2014; 9(6):e99396; Zhang W, Du JY, Jiang Z, Okimura T, Oda T, Yu Q and Jin JO. Marine Drugs. 2014; 12(7):4148-4164; 및 Zhang W, Cho SY, Xiang G, Min KJ, Yu Q and Jin JO. PloS one. 2015; 10(6):e0130926). 간단하게, 조직은 작은 조각으로 잘리고, 상온에서 20분 동안 콜라게네이즈를 포함하는 2% FBS(fetal bovine serum)로 분해하였다. 분해된 세포는 원심분리되었고, 펠렛은 5 ml의 1.077 histopaque (Sigma-Aldrich)로 재용해시켰다. 이후, 1700g에서 10 분 동안 원심분리하여 추가된 histopaque 가 아래 층으로 구성되고, 1 ml의 배지가 위쪽으로 각각 배치되었다. 가벼운 밀도층(light density fraction; $< 1.077 \text{ g/cm}^3$)이 모아지고, 다음의 FITC-conjugated mAbs (monoclonal antibodies)로 20분 동안 처리되었다: anti-CD3 (17A2), anti-Thy1.1 (OX-7), anti-B220 (RA3-6B2), anti-Gr1 (RB68C5), anti-CD49b (DX5) 및 anti-TER-119 (TER-119). lineage⁻CD11c⁺ 세포는 cDCs로 정의

하였고, CD8 α^+ 및 CD8 α^- cDCs로 분류하였다. 분석은 FACS Aria II (Becton Dickinson)로 수행되었다.

1.7. *Ex vivo* T 세포 자극 및 세포 내의 사이토카인 염색

기존에 자세하게 기재된 바와 같이(Jin JO, Han X and Yu Q. Journal of autoimmunity. 2013; 40:28-44), 비장 및 중앙 drLN으로부터 준비된 단세포 현탁액은 PMA(phorbol 12-myristate 13-acetate, 50 ng/ml; Calbiochem)와 이오노마이신(ionomycin, 1 μ M; Calbiochem)으로 4시간 동안 *in vitro*에서 자극되었고, 최종 2시간 동안 모넨신 용액(monensin solution; Biolegend)이 추가되었다. 포 내의 사이토카인 염색을 위하여, 세포는 먼저 표면분자가 염색되었고, Cytofix/Cytoperm buffer (eBioscience)로 고정되고 투과되었으며, 순차적으로 30분 동안 Perm/Wash buffer (eBioscience)에 들어있는 anti-cytokine 항체로 배양되었다. isotype control IgGs로의 대조군 염색은 모든 실험에서 수행되었다.

1.8. ELISA

혈청에 있는 IL-6, IL-12p70, IFN- γ 및 TNF- α 의 농도는 standard ELISA kits (Biolegend)으로 세 번 반복하여 측정되었다.

1.9. Real-time PCR

총 RNA는 Oligo (dT)와 M-MLV reverse transcriptase (Promega)를 사용하여 역전사시켰다. cDNA는 real-time PCR amplification kit(Qiagen)를 사용하여 60 $^{\circ}$ C의 어닐링 온도로 하여 40 사이클을 반복하였고, LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche)을 사용하였다. 프라이머 서열은 하기의 표 1과 같다.

표 1

유전자	프라이머 방향	서열번호
mouse β -Actin	forward	5'-TGGATGACGATATCGCTGCG-3' (서열번호 3)
	reverse	5'-AGGGTCAGGATACCTCTCTT-3' (서열번호 4)
IL-6	forward	5'-AACGATGATGCACTTGCAGA-3' (서열번호 5)
	reverse	5'-GAGCATTGGAATTGGGGTA-3' (서열번호 6)
IL-12p40	forward	5'-CACATCTGCTGCTCCACAAG-3' (서열번호 7)
	reverse	5'-CCGTCCGGAGTAATTGGTG-3' (서열번호 8)
IL-23p19	forward	5'-CTC TCG GAATCTCTGCAT GC-3' (서열번호 9)
	reverse	5'-ACCATCTTCACACTGGATACG-3' (서열번호 10)
TNF- α	forward	5'-CCTTTCACCTACTGGCCCAA-3' (서열번호 11)
	reverse	5'-AGTGCCTCTTCTGCCAGTTC-3' (서열번호 12)
T-bet	forward	5'-CAACAACCCCTTGCCAAAG-3' (서열번호 13)
	reverse	5'-TCCCCAAGCATTGACAGT-3' (서열번호 14)
GATA3	forward	5'-CGGGTTCGGATGTAAGTCGAGG-3' (서열번호 15)
	reverse	5'-GATGTCCCTGCTCTCCTTGCTG-3' (서열번호 16)
ROR γ t	forward	5'-CCGCTGAGAGGGCTTCAC-3' (서열번호 17)
	reverse	5'-TGCAGGAGTAGGCCACATTACA-3' (서열번호 18)
IFN- γ	forward	5'-GGATGCATTATGAGTATTGC-3' (서열번호 19)
	reverse	5'-CTTTTCCGCTCCTGAGG-3' (서열번호 20)
IL-4	forward	5'-ACAGGAGAAGGGACGCCAT-3' (서열번호 21)
	reverse	5'-GAAGCCCTACAGACGAGCTCA-3' (서열번호 22)
IL-17A	forward	5'-GCGCAAAAGTGAGCTCCAGA-3' (서열번호 23)
	reverse	5'-ACAGAGGGATATCTATCAGGG-3' (서열번호 24)

1.10. OT-I 및 OT-II T 세포 증식

- [0071] OT-II 마우스로부터의 CD4 T 세포 또는 OT-I 마우스로부터 CD8 T 세포가 CD4 T cell or CD8 T cell isolation kit (Miltenyi Biotec)을 사용하여 비장으로부터 각각 분리되었다. 세포는 10 μ M CFSE (Invitrogen)를 포함하는 0.1% BSA(in PBS)에서 현탁되었고 10분동안 배양되었다. CFSE-레이블된 세포(1×10^6)는 CD45.1 컨지닉 마우스에 정맥주사(*i.v.*)로 전달되었고, 24시간 후 마우스에 PBS, OVA(in PBS) 및 OVA-폴룰란을 주입하였다. 처리 후 72시간에 비장세포는 모아지고, 유세포분석기에 의해 CFSE 형광 강도를 분석함으로써 OT-I 또는 OT-II T 세포 증식이 결정되었다.
- [0073] **1.11. 종양 침윤된 T 세포의 분석**
- [0074] OT-I 또는 OT-II 세포는 B16-OVA 종양을 가진 CD45.1 컨지닉(congenic) 마우스에 이식되었고, 24시간 뒤, 마우스에는 PBS, OVA, 폴룰란 및 OVA-폴룰란이 주입되었다. 주입 후 3일 뒤에는 종양이 모아지고 종양의 무게가 측정되었다. 종양은 작은 조각으로 잘리고, 상온에서 20분 동안 콜라게네이즈를 포함하는 2% FBS(fetal bovine serum)로 분해하였다. 분해된 세포는 원심분리되었고, 펠렛은 4 ml의 histopaque (Sigma-Aldrich)로 재용해시켰다. 이후, 1700g에서 10분 동안 원심분리하여 추가된 histopaque 가 아래 층으로 구성되었다. 가벼운 밀도층(light density fraction; $< 1.077 \text{ g/cm}^3$)이 모아지고, anti-CD45.2, anti-CD3, anti-CD4, 및 anti-CD8로 염색되었다. 침윤된 OT-I 및 OT-II 세포는 CD3^+ 세포에서 $\text{CD45.2}^+\text{CD8}^+$ 또는 $\text{CD45.2}^+\text{CD4}^+$ 으로 정의되었다.
- [0076] **1.12. 비장내(intrasplenic) 주입**
- [0077] C57BL/6 마우스는 케타민 혼합물(10 μ L ketamine HCl, 7.6 μ L xylazine, 2.4 μ L acepromazine maleate, 및 10 μ L H₂O)을 복막강으로 주입하여 마취하였다. B16-OVA 흑색종 세포(0.5×10^6 /50 μ L)는 실험을 위한 열린 개복술(open laparotomy) 동안 마우스의 비장으로 주입되었다.
- [0079] **1.13. *In vivo* 세포 독성 분석**
- [0080] 기존에 기재된 바와 같이(Zhang W, Okimura T, Xu L, Zhang L, Oda T, Kwak M, Yu Q and Jin JO. Oncotarget. 2016), 마우스에는 CFSE (20 nM)로 구별하여 레이블된 비장세포의 혼합물을 정맥주사(*i.v.*)로 주입되었고, 10 nM SIINFEKL 펩타이드가 주입되었다. 또한, 10 mM CellTracker™ Orange CMTMR (Life technologies)로 레이블된 비장세포가 주입된 마우스에는 상기 펩타이드가 주입되지 않았다. 마우스 당 총 10×10^6 세포가 주입되었고, 이는 각 타겟 세포군을 포함하는 혼합물로 이루어진 것이다. 비장세포는 타겟 세포의 주입 후 6시간 후에 모아졌다. 죽은 세포의 퍼센트는 기존에 기재된 공식을 사용하여 계산되었다(Hermans IF, Silk JD, Yang J, Palmowski MJ, Gileadi U, McCarthy C, Salio M, Ronchese F and Cerundolo V. Journal of immunological methods. 2004; 285(1):25-40).
- [0082] **1.14. IFN- γ ELISPOT 어세이**
- [0083] 비장세포는 최종 면역화시킨 후 7일에서 분리되었고, 10 μ g/mL rat anti-mouse IFN- γ capture mAbs가 코팅된 ELISPOT 플레이트 (Nunc)에서 100 ng 의 SIINFEKL 펩타이드(OVA)가 추가되어 배양되었다. 18시간 후, 세척된 플레이트에는 2 μ g/mL biotinylated rat anti-mouse IFN- γ mAbs (Biolegend)가 처리되고, avidin conjugated alkaline phosphatase (nce)와 50 μ L AEC substrate solution (Sigma-Aldrich)가 처리되었다. 스왓은 Bioreader 3000 (Biosys)으로 계산되었다.
- [0085] **1.15. 통계분석**
- [0086] 결과는 평균±표준오차(SEM; standard error of the mean)로 표현하였다. 실험군 사이의 통계적 유의성은 Bonferroni post-test 또는 unpaired Student's t-test에 의한 분산분석(analysis of variance)을 사용하여 계산되었다. 모든 *p-value* < 0.05 는 유의한 것으로 간주되었다.

[0088] **실시예 2. 풀물란에 의한 DC 활성화 촉진 효과**

[0089] 기존 연구에서 풀물란은 인간 전혈 배양에서 전-염증성 사이토카인의 생산을 유도하는 것으로 나타났다(Noss I, Doekes G, Thorne PS, Heederik DJ and Wouters IM. *Innate immunity*. 2013; 19(1):10-19). 그러나, *in vitro* 및 *in vivo* 에서의 DC 활성화에 관한 풀물란의 효과는 잘 설명되지 않았다. 본 발명자들은 풀물란이 *in vitro* 에서 BMDC(bone marrow-derived DCs)의 활성을 유도하는지, *in vivo* 에서 비장의 cDCc를 유도하는지를 실험하였다. C57BL/6 마우스로부터 분리된 골수세포는 6일 동안 GM-CSF(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) 및 IL-4(interleukin-4)를 추가하여 배양되었다. 이후, 세포는 24시간 동안 1, 5 및 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 풀물란이 처리되었고, 양성대조군으로는 LPS가 사용되었다.

[0090] 그 결과, 5 및 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 풀물란이 처리한 군에서는 현저하게 BMDC에서의 수지상세포의 형태적 변화를 촉진시켰고(도 1A), MHC class II 및 공동-촉진 분자인 CD40, CD80 및 CD86의 발현을 상당히 상향 조절시켰다(도 1B).

[0091] 다음으로, 본 발명자들은 풀물란이 *in vivo* 에서 비장 cDC의 활성을 유도할 수 있는지 실험하였다. C57BL/6 마우스에는 5, 25 및 50 mg/kg 풀물란으로 정맥주사(*i.v.*)로 주입되었고, 양성대조군으로는 30 μg LPS가 사용되었다. 마우스는 24시간 뒤에 비장 cDC 활성을 분석하였다.

[0092] 그 결과, 기대한 바대로, LPS 처리는 비장 cDC의 비율 및 수에서 상당한 증가를 유도하였고, 이는 lineage⁻CD11c⁺ 세포로서 동정되었다. 대조적으로 풀물란의 처리는 비장 cDC의 비율 및 수에서의 어떠한 변화를 일으키지 않았다(도 1C 및 1D). 그러나, LPS와 유사하게, 풀물란은 25 및 50 mg/kg 용량에서 공동-촉진 분자 및 MHC class I과 MHC class II 분자의 상향조절을 유도하였다(도 1E).

[0093] 따라서, 풀물란은 *in vitro* 에서 BMDC의 활성을 유도하며, *in vivo* 에서 비장 cDC의 활성을 유도함을 확인하였다.

[0095] **실시예 3. DC에서 풀물란에 의한 전-염증성 사이토카인 생산 촉진 효과**

[0096] 풀물란이 DC에서 전-염증성 사이토카인의 생산에 영향을 주는지 알아보기 위하여, 본 발명자들은 BMDC 또는 C57BL/6 마우스에 풀물란을 처리하였다. 풀물란-처리된 BMDC에서는 PBS-처리된 BMDC와 비교하여 IL-6, IL-12p40 및 TNF- α mRNA의 발현량이 상당히 증가하였다(도 2A). mRNA 발현량과 일치하게, 풀물란이 처리된 BMDC의 배양된 배지에서 IL-6, IL-12p70 및 TNF- α 의 분비량은 PBS를 처리한 것에 비해 현저하게 증가되었다(도 2B). 더욱이, 풀물란의 *in vivo* 투여에서는 비장세포에서 IL-6, IL-12p40 및 TNF- α mRNA 발현량이 상당히 증가되었다(도 2C). 또한, 풀물란-처리된 마우스에서 혈청의 IL-6, IL-12p70 및 TNF- α 의 양은 대조군 마우스에 비해 상당히 증가되었다(도 2D).

[0097] 풀물란이 전-염증성 사이토카인의 생산을 위하여 비장 DC를 촉진시키는지를 측정하기 위하여, 본 발명자들은 풀물란-처리된 비장 cDC에서 세포 내 사이토카인 생산 여부를 실험하였다. 도 2E에서 보는 바와 같이, 풀물란 처리는 PBS 처리된 군과 비교하여 IL-6, IL-12 및 TNF- α -생산하는 비장 cDC의 퍼센트에서 상당히 증가되었다.

[0098] 따라서, 풀물란은 *in vitro* 에서 BMDC의 활성을 유도하며, *in vivo* 에서 비장 cDC의 활성을 유도하며, 이는 공동-촉진 분자의 상향조절 및 전-염증성 사이토카인의 생산에 의한 것으로 확인하였다.

[0100] **실시예 4. 풀물란에 의한 Th1 및 Tc1 면역반응의 유도 효과**

[0101] 풀물란이 *in vivo* 에서 비장 cDC 활성을 유도한다는 것을 확인으로부터, 본 발명자들은 비장 cDC가 T 세포 활성을 촉진시킬 수 있는지를 실험하였다. C57BL/6 마우스에는 풀물란이 3일 간격으로 두 번 정맥주사(*i.v.*)로 주입되었고, 두 번째 주입 후 3일 뒤에 분석되었다. 풀물란 처리는 비장에서 IFN- γ -생산 CD4 및 CD8 T 세포의 퍼센트에서 상당한 증가를 유도한 반면, IL-4과 IL-17-생산 CD4 및 CD8 T 세포의 퍼센트에는 어떠한 영향을 주지 않았다(도 3A). 또한, 혈청에서의 IFN- γ 농도는 풀물란 처리에 의하여 상당히 증가되었다(도 3B). 더욱이, Th1 및 Tc1 세포에서의 중요한 전사인자인 IFN- γ 및 T-bet의 mRNA 발현량은 풀물란 처리에 의하여 비장세포에서 현저히 증가된 반면, Th2 및 Th17에 대한 중요한 전사인자인 GATA3 및 ROR γ t의 mRNA 발현량과 IL-4 and IL-17A

은 변화되지 않았다(도 3C).

[0102] 따라서, 폴룰란의 투여는 *in vivo* 에서의 Th1 및 Tc1 면역반응을 촉진한다는 것을 확인하였다.

[0104] **실시예 5. 폴룰란에 의한 항원-특이적인 T 세포 면역반응의 향상 효과**

[0105] 본 발명자들은 폴룰란이 항원 제시 및 항원-특이적 T 세포 활성을 포함하는 항원-특이적 면역반응을 촉진시킬 수 있는지를 실험하였다. C57BL/6 마우스에는 PBS, 50 µg OVA (ovalbumin), 25 mg/kg 폴룰란 또는 OVA(50 µg)-폴룰란(25 mg/kg)의 조합(OVA-폴룰란)으로 주입되었고, 24 후 CD8 α⁺CD11c⁺ 및 CD8 α⁻CD11c⁺ 비장 cDC에서 MHC class I 및 II의 발현량을 측정하였다. CD8 α⁺CD11c⁺ 및 CD8 α⁻CD11c⁺ 비장 cDC에서 OVA-폴룰란의 조합은 OVA 단독 처리에 비해 MHC class I 및 II 발현에 있어 상당한 상향조절을 유도하였다(도 4A).

[0106] 또한, OVA-폴룰란의 조합으로 유도된 비장 DC에서의 MHC class I 및 II 발현의 상향조절이 차례로 OVA-특이적 OT-I 및 OT-II T 세포 증식을 촉진할 수 있는지를 알아보기 위하여, 본 발명자들은 CFSE-레이블된 OT-I 및 OT-II T 세포를 CD45.1 컨지닉 마우스로 주입하였다. 24시간 후, 본 발명자들은 CFSE 회색에 의한 세포 증식을 분석하기 전에 PBS, 50 µg OVA (ovalbumin), 25 mg/kg 폴룰란 또는 OVA(50 µg)-폴룰란(25 mg/kg)의 조합(OVA-폴룰란)을 마우스에 처리하였다. 그 결과, OVA-폴룰란의 처리는 OVA 또는 폴룰란 단독 처리에 비해 비장에서의 OT-I 및 OT-II T 세포의 증식을 상당히 증가시켰다(도 4B).

[0107] 폴룰란의 애쥬번트 효과를 알아보기 위하여, C57BL/6 마우스는 0, 7 및 14일째에 OVA, 폴룰란 및 OVA-폴룰란의 조합으로 면역화되었다. 21일째에는 H-2^b-SIINFEKL tetramer staining 및 IFN-γ ELISPOT 어세이에 의해 OVA-특이적인 CD8 T 세포 면역반응을 측정하였다. H-2^b-SIINFEKL tetramer staining의 결과에서 OVA-폴룰란의 처리는 OVA-특이적 CD8 세포의 퍼센트를 매우 증가시킨 반면, OVA 또는 폴룰란 단독 처리는 OVA-특이적 CD8 세포의 증가를 촉진시키지 못했다(도 4C). 또한, OVA (257-264) 펩타이드인 SIINFEKL에 대한 IFN-γ-생산 CD8 T 세포의 수에 있어, OVA-폴룰란이 처리된 비장세포에서는 OVA 또는 폴룰란 단독 처리에 비해 상당히 증가되었다(도 4D).

[0108] 따라서, 폴룰란은 CD8 α⁺CD11c⁺ 및 CD8 α⁻CD11c⁺ 비장 cDC에 의한 항원 제시기능을 향상시킴으로써, 항원-특이적인 T 세포 면역반응을 촉진하며, 이로부터 *in vivo* 에서 면역 애쥬번트로서 기능함을 확인하였다.

[0110] **실시예 6. 종양환경에서 폴룰란에 의한 항원-특이적인 면역반응의 유도 효과**

[0111] 폴룰란이 비장 cDC 세브셋에서 항원 제시를 향상시키고, *in vivo* 에서 항원-특이적인 T 세포 활성을 촉진시킨다는 결과로부터, 본 발명자들은 폴룰란이 종양을 가진 마우스(tumor-bearing mice)에서 유사한 면역 활성을 유도할 수 있는지 실험하였다. C57BL/6 마우스에는 1 x 10⁶ B16 흑색종 세포가 정맥주사(*s.c.*)로 주입되었다. 종양 세포 주입 후 25일 뒤, 마우스에는 OVA-폴룰란이 정맥주사(*s.c.*)로 주입되었고, 24시간 뒤 비장 및 종양 drLN(tumor draining lymph node: 림프절)에서의 cDC의 활성을 분석하였다. 그 결과, 종양을 가진 마우스에 OVA-폴룰란의 처리는 종양 drLN에서의 DC의 퍼센트 및 수에서 상당한 증가를 보인 반면, 비장에서는 어떠한 변화도 없었다(도 5A 및 5B). 더욱이, 비장 및 종양 drLN에서의 CD8 α⁺CD11c⁺ 및 CD8 α⁻CD11c⁺ cDC 에서의 MHC class I 및 II 발현량은 OVA-폴룰란의 조합에 의해 상당히 상향조절된 반면, OVA 단독에 의해서는 상향조절되지 않았다(도 5C).

[0112] 다음으로, 본 발명자들은 OVA-폴룰란의 조합이 종양을 가진 마우스에서 OVA 특이적인 T 세포 활성을 유도할 수 있는지 실험하였다. CD45.1 컨지닉 마우스에는 1 x 10⁶ B16-OVA 흑색종 세포가 정맥주사(*s.c.*)로 주입되었다. 본 발명자들은 종양의 평균 부피가 500-1000 mm³ 일 때, CFSE-레이블된 OT-I 및 OT-II T 세포를 종양을 가진 CD45.1 컨지닉 마우스로 주입하였다. 24시간 후, PBS, OVA, 폴룰란 또는 OVA-폴룰란이 마우스로 주입되었고, 3일 후 분석되었다. OVA-폴룰란의 조합은 OVA 또는 폴룰란을 주입한 것에 비해 종양을 가진 마우스에서 비장 OT-I 및 OT-II T 세포의 증식에 있어 상당한 증가를 유도하였다(도 5D). 또한, OVA-폴룰란의 조합은 종양에서의 OT-I 및 OT-II T 세포의 상당한 침윤을 유도한 반면, OVA 단독에서는 그러하지 않았다(도 5E).

[0113] 따라서, 폴룰란은 종양환경에서 항원-특이적인 면역반응을 촉진시킬 수 있음을 확인하였다.

[0115] 실시예 7. OVA-폴룰란에 의한 B16-OVA 종양 억제 효과

[0116] OVA-폴룰란의 조합은 종양환경에서 OVA 특이적인 면역반응을 향상시킬 수 있다는 결과로부터, 본 발명자들은 OVA-폴룰란의 조합이 *in vivo* 에서 B16-OVA 종양 성장을 억제할 수 있는지 실험하였다. C57BL/6 마우스에는 1×10^6 B16-OVA 세포가 정맥주사(*s.c.*)로 주입되었다. 종양의 평균 부피가 30-40 mm³ 가 될 때, 마우스에는 PBS, 50 µg OVA, 25 mg/kg 폴룰란 또는 OVA-폴룰란의 조합이 종양 형성 후 7, 14 및 21일에 주입되었다. 그 결과, OVA-폴룰란의 조합은 PBS, OVA 및 폴룰란을 단독 처리한 것이 비해 B16-OVA 종양 성장을 현저하게 억제시켰다(도 6A). 또한, OVA-폴룰란의 조합으로 처리된 마우스는 PBS, OVA 및 폴룰란이 단독 처리된 마우스에 비해 생존 기간이 길었다(도 6B). 도 6C에서 보는 바와 같이, 24일째에 OVA-폴룰란의 조합으로 처리된 마우스에서의 종양 덩어리의 크기는 OVA 및 폴룰란이 단독 주입된 마우스에 비해 상당히 적었다. 또한, OVA-폴룰란이 처리된 종양을 가진 마우스의 몸무게는 점차적으로 증가되었으나, OVA 또는 폴룰란이 처리된 마우스의 몸무게는 종양 형성 후 21일 째에 높았으나, 이후 급격히 감소되었다(도 6D).

[0117] 다음으로, 본 발명자들은 *in vivo* 세포독성 어세이를 이용하여 CTL(cytotoxic T lymphocyte)의 기능적 활성을 실험하였다. C57BL/6 마우스는 0, 7 및 14일에 OVA, 폴룰란 또는 OVA-폴룰란의 조합으로 면역화되었다. 초기 면역화 후 21일 째에 마우스에는 C57BL/6 공여(donor) 마우스로부터의 CFSE-레이블된 및 SIINFEKL-펩스틴 비장세포와 CMTMR-레이블된 및 비-펩타이드가 비장세포가 정맥주사(*i.v.*)로 주입되었고, 유세포분석기에 의해 특이적인 세포 용해를 측정하였다. 특이적인 타겟 세포 용해는 OVA-폴룰란의 조합에 의해 면역화된 마우스에서 80% 이었다(도 6E). 대조적으로, OVA 또는 폴룰란 단독에 의해 면역화된 마우스는 OVA-펩스틴 비장세포의 상당한 사멸을 보이지 않았다(도 6E).

[0118] 따라서, OVA 면역화와 결합된 폴룰란의 처리는 *in vivo* 에서 B16-OVA 종양 성장을 억제시킴을 확인하였다.

[0120] 실시예 8. OVA-폴룰란의 조합에 의한 B16-OVA 흑색종 세포의 간 전이(liver metastasis) 억제 효과

[0121] 본 발명자들은 OVA-폴룰란의 조합이 마우스에서 종양의 전이를 억제할 수 있는지 실험하였다. 마우스에는 PBS, 50 µg OVA, 25 mg/kg 폴룰란 또는 OVA-폴룰란의 조합이 정맥주사(*i.v.*)로 주입되었다. 3일 후, 마우스에는 0.5×10^6 B16-OVA 흑색종 세포가 비장내(*i.s.*)로 접종되었고, PBS, OVA, 폴룰란 또는 OVA-폴룰란의 조합이 3일 간격으로 두 번 정맥주사(*i.v.*)로 주입되었다. PBS, OVA 및 폴룰란이 단독 처리된 마우스는 종양 형성 후 18일 내에 죽었다. 대조적으로, OVA-폴룰란의 조합으로 처리된 마우스는 26일에 처음 죽었고, 모든 마우스는 28일 내에 죽었다(도 7A). 더욱이, B16-OVA 세포의 주입 후 14일 째에 비장에서의 종양 덩어리의 크기는 다른 그룹에 비해 OVA-폴룰란의 조합으로 처리된 마우스에서 상당히 작았음을 확인하였다(도 7B). 또한, OVA-폴룰란의 조합으로 처리된 마우스는 간으로의 B16-OVA 세포 침입으로부터 완전히 보호된 반면, PBS, OVA 및 폴룰란 단독으로 처리된 마우스에는 간에서 B16-OVA 종양세포가 상당한 수로 관찰되었다(도 7B 및 7C). 또한, 비장 및 간의 무게는 다른 그룹에 비해 OVA-폴룰란의 조합으로 처리된 마우스에서 상당히 가벼웠다(도 7D).

[0122] 따라서, OVA-폴룰란의 조합은 B16-OVA 흑색종 세포의 간 전이(liver metastasis)를 억제함을 확인하였다.

[0124] 실시예 9. 자가 종양(self tumor)-관련 항원 및 폴룰란의 조합에 의한 B16 흑색종 성장의 억제 효과

[0125] 자가 종양-관련 항원에 대한 폴룰란의 애췌버트 활성을 확신하기 위하여, 본 발명자들은 B16 흑색종을 가진 마우스에 TRP2(tyrosinase-related protein 2) 펩타이드와 폴룰란의 조합을 처리하여 실험하였다. C57BL/6 마우스에는 1×10^6 B16 세포가 정맥주사(*s.c.*)로 주입되었다. 종양의 평균 부피가 30-40 mm³ 에 이를 때, 마우스에는 PBS, 50 µg TRP2 펩타이드, 25 mg/kg 폴룰란 또는 TRP2 펩타이드-폴룰란의 조합이 종양 형성 후 7, 14 및 21일 째에 주입되었다. 양성대조군으로서, 마우스에는 TRP2 펩타이드와 LPS의 조합이 주입되었다. 그 결과, TRP2 펩타이드-폴룰란의 조합은 PBS, TRP2 펩타이드 및 폴룰란이 단독 처리된 것에 비해 B16-OVA 종양 성장이 상당히 억제되었다(도 8A). 더욱이, 24일 째에서 TRP2 펩타이드-폴룰란의 조합으로 처리된 마우스에서의 종양 덩어리의 크기는 TRP2 펩타이드 또는 폴룰란 단독으로 주입된 마우스에서 보다 훨씬 작았다(도 8B). 또한, TRP2 펩타이드-폴룰란의 조합으로 처리된 마우스는 TRP2 펩타이드 또는 폴룰란이 단독 주입된 마우스에 비해 생존기

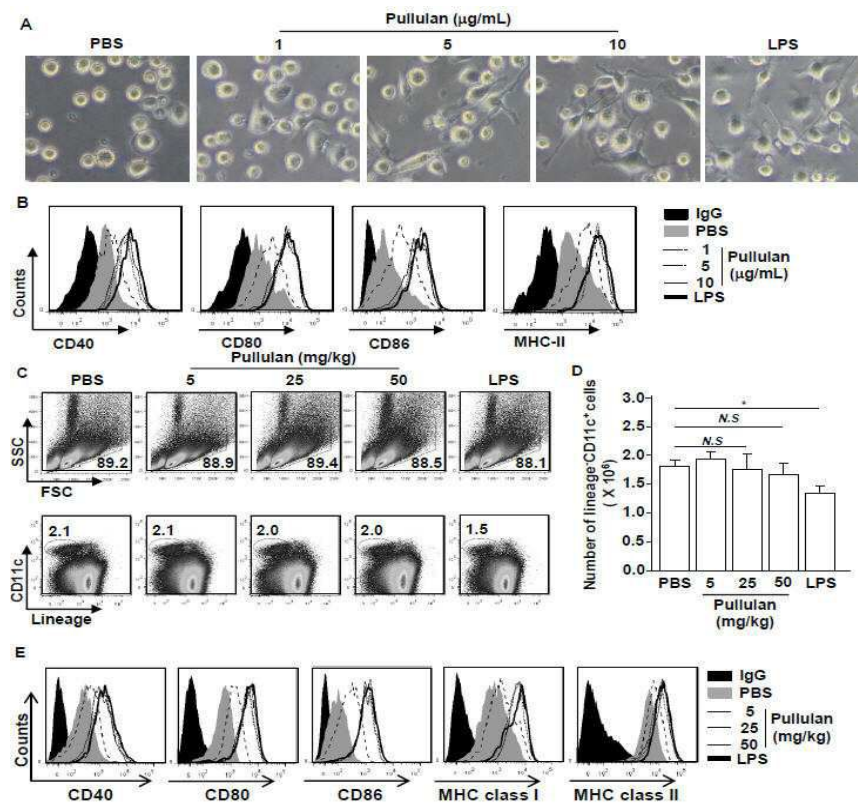
간이 훨씬 길었다(도 8C). 더욱이, 풀룰란은 종양 성장의 억제에 있어 LPS와 거의 동일한 애췌번트 활성을 보였다. 그러나, LPS와 달리, 풀룰란은 마우스에서 종양을 치료하는 동안 몸무게가 줄어들지 않았다(도 8D).

[0126]

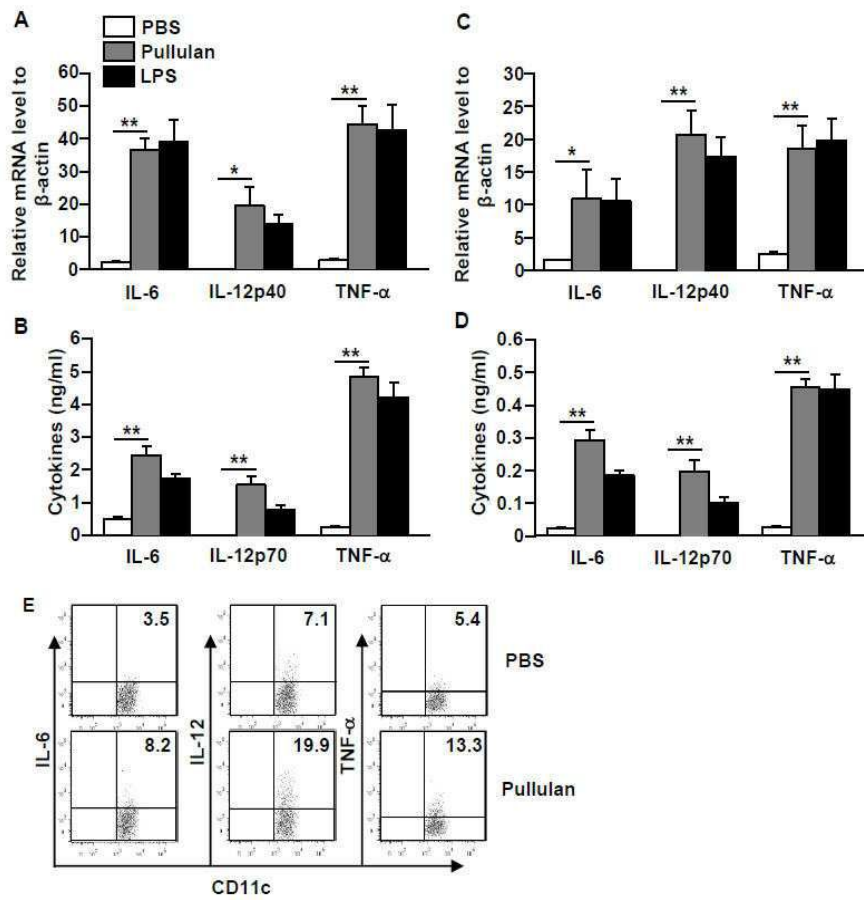
따라서, 자가 종양-관련된 항원과 조합된 풀룰란의 처리는 LPS 보다 안전하게 *in vivo* 에서 흑색종 성장을 억제할 수 있음을 확인하였다.

도면

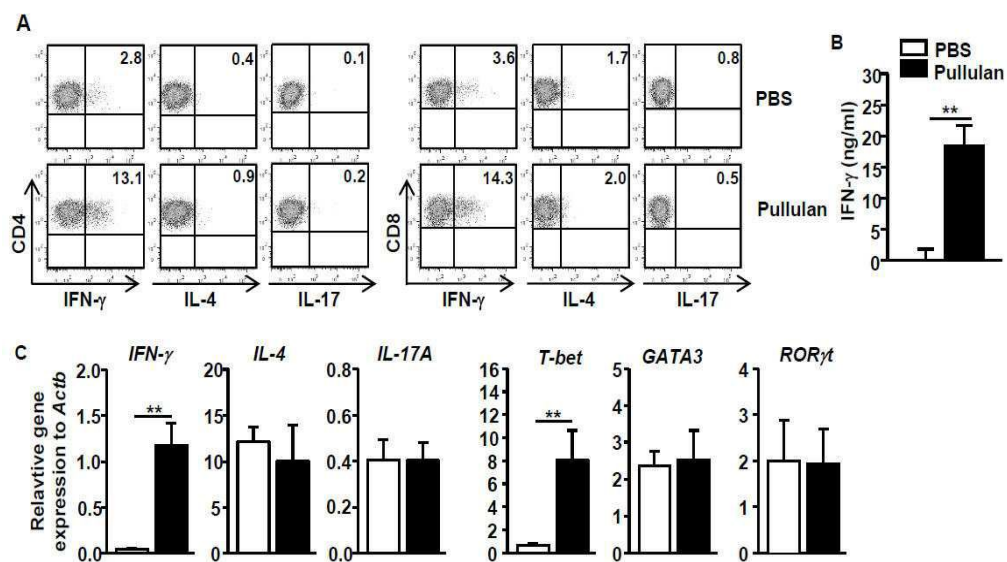
도면1



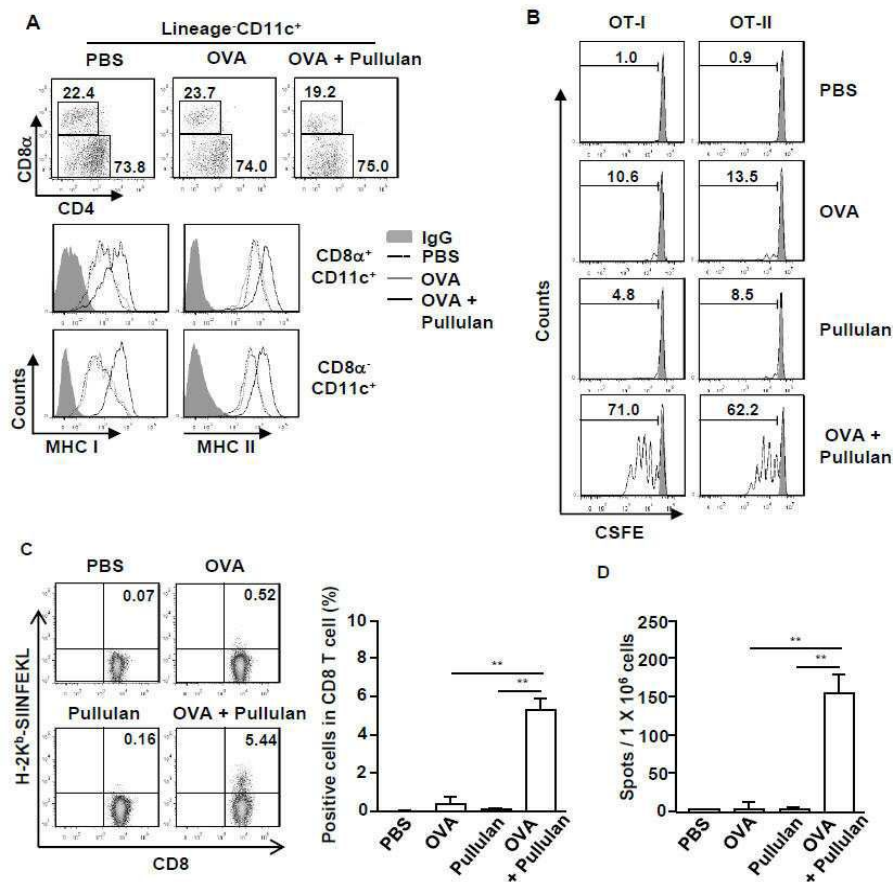
도면2



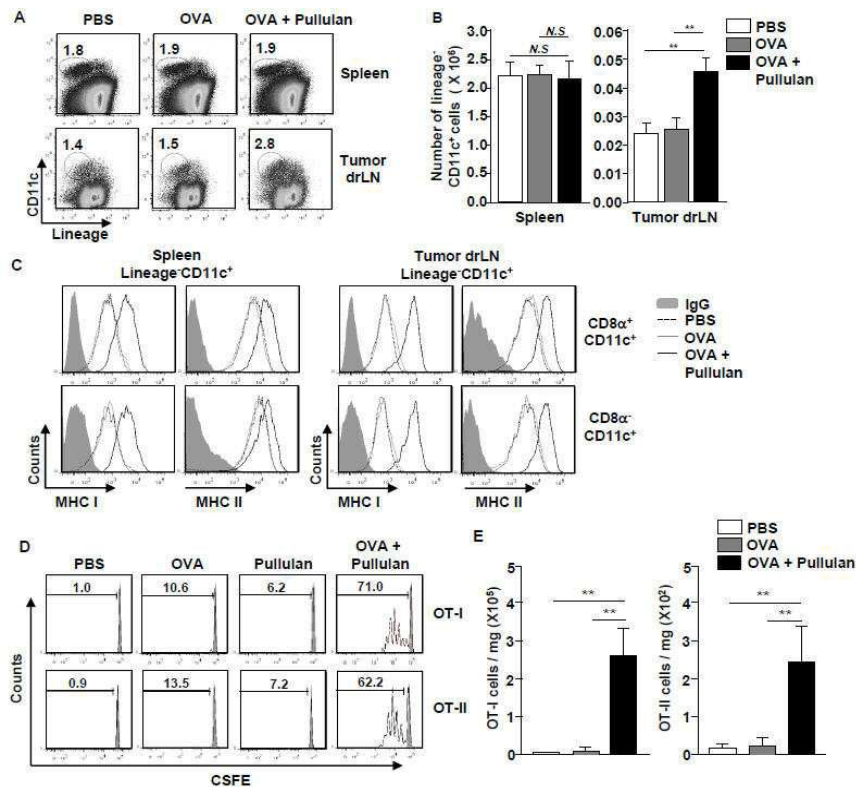
도면3



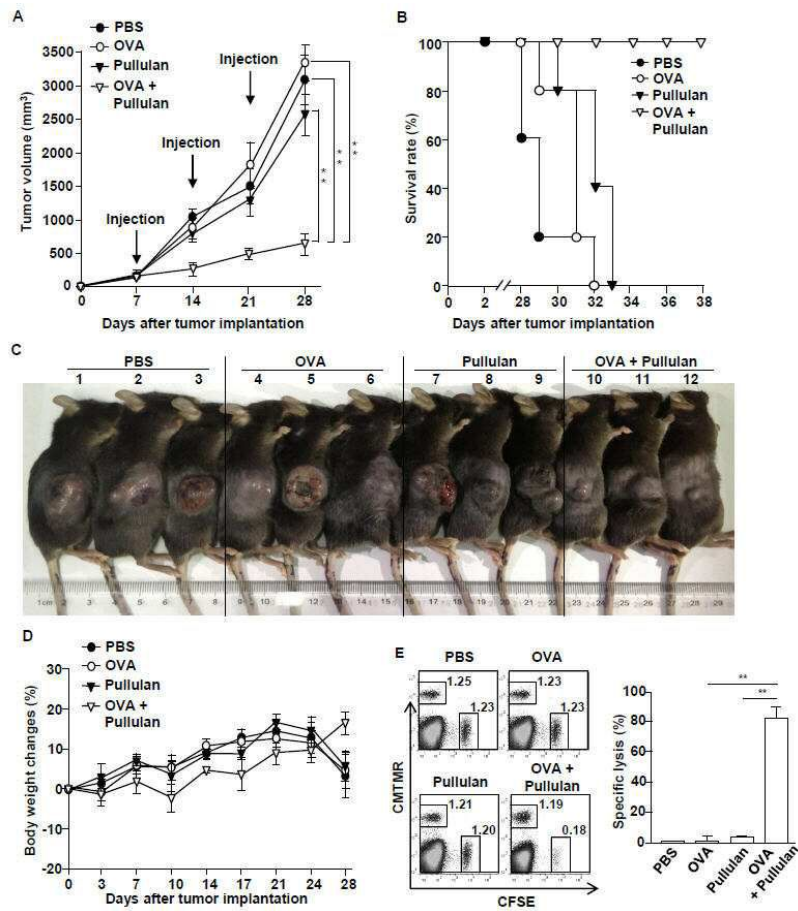
도면4



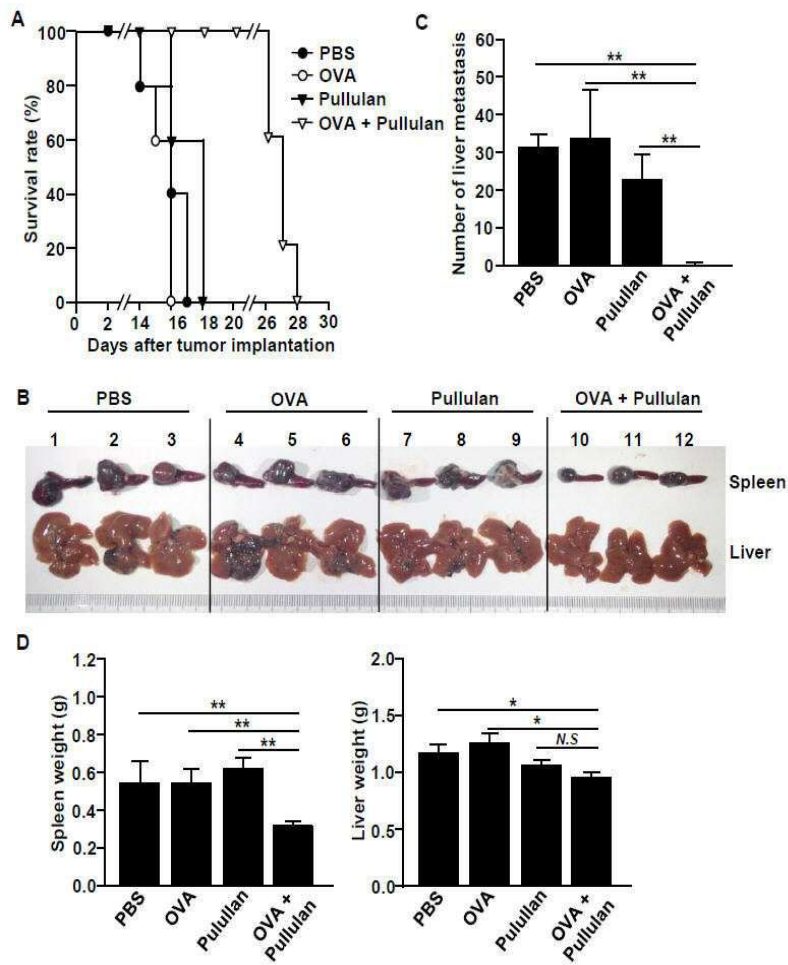
도면5



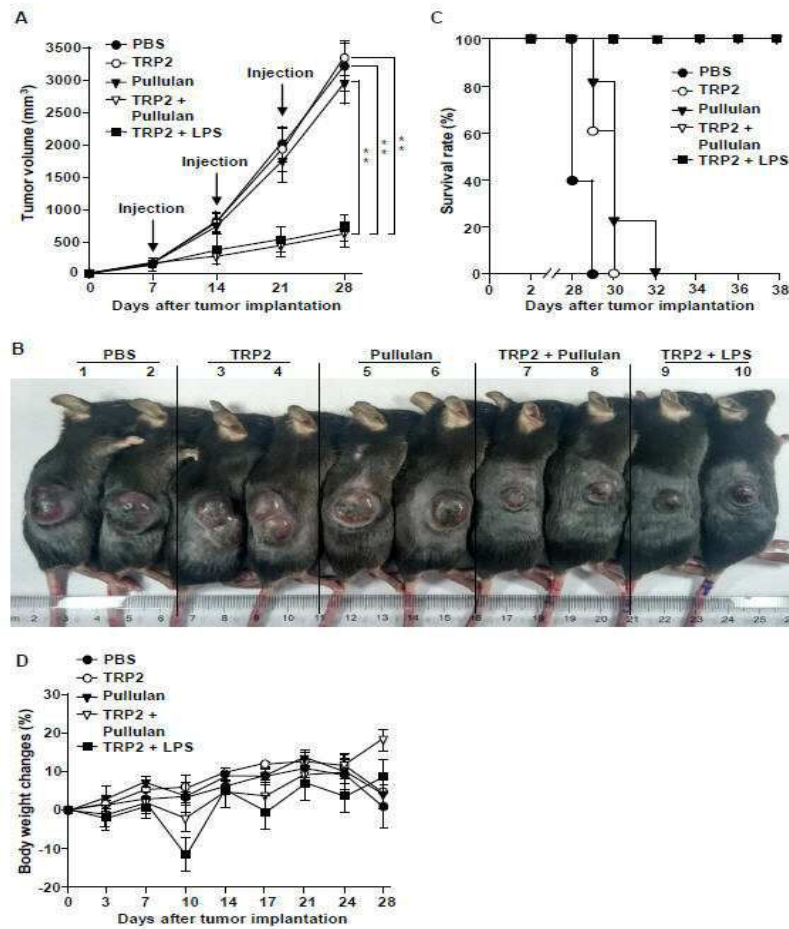
도면6



도면7



도면8



서열목록

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation of Pukyong University

<120> Adjuvant composition comprising pullulan as active ingredient

<130> PN1610-353

<160> 24

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial sequence

<400> 1

Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu

1 5

<210> 2

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> aritificial sequence
 <400>

2

Ser Val Tyr Asp Phe Phe Val Trp Leu

1 5

<210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> aritificial sequence
 <400> 3

tggatgacga tatcgctgcg

20

<210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> aritificial sequence
 <400> 4

agggtcagga tacctctctt

20

<210> 5
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> aritificial sequence
 <400> 5

aacgatgatg cacttgcaga

20

<210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> aritificial sequence

<400>	6	
	gagcattgga aattggggta	20
<210>	7	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	aritificial sequence	
<400>	7	
	cacatctgct gctccacaag	20
<210>	8	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	aritificial sequence	
<400>	8	
	ccgtccggag taatttgggtg	20
<210>	9	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	aritificial sequence	
<400>	9	
	ctctcggaat ctctgcatgc	20
<210>	10	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	aritificial sequence	
<400>	10	
	accatcttca cactggatac g	21
<210>	11	
<211>	20	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence
 <220><223> aritificial sequence
 <400> 11
 cctttcactc actggcccaa 20
 <210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> aritificial sequence
 <400> 12
 agtgcctctt ctgccagttc 20
 <210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> aritificial sequence
 <400> 13
 caacaacccc ttgccaaag 20
 <210> 14
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> aritificial sequence
 <400> 14
 tcccccaagc attgacagt 19
 <210> 15
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> aritificial sequence
 <400> 15
 cgggttcgga tgtaagtcga gg 22
 <210> 16

<211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> aritificial sequence
 <400> 16
 gatgtccctg ctctccttg tg 22
 <210> 17
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> aritificial sequence
 <400> 17
 ccgctgagag ggcttcac 18
 <210> 18
 <211> 22

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> aritificial sequence
 <400> 18
 tgcaggagta ggccacatta ca 22
 <210> 19
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> aritificial sequence
 <400> 19
 ggatgcattc atgagtattg c 21
 <210> 20
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> aritificial sequence
 <400> 20

cttttcgct tcctgagg	18
<210> 21	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> aritificial sequence	
<400> 21	
acaggagaag ggacgccat	19
<210> 22	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> aritificial sequence	
<400> 22	
gaagccctac agacgagctc a	21
<210> 23	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> aritificial sequence	
<400> 23	
gcgcaaaagt gagctccaga	20
<210> 24	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> aritificial sequence	
<400> 24	
acagagggat atctatcagg g	21