



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0150631
(43) 공개일자 2022년11월11일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0784 (2010.01) A61K 35/15 (2015.01)
A61P 11/06 (2006.01) A61P 17/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01) A61P 37/06 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/0639 (2013.01)
A61K 35/15 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2021-0057853
(22) 출원일자 2021년05월04일
심사청구일자 2021년05월04일
- (71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
- (72) 발명자
권병석
울산광역시 울주군 청량읍 삼정로 92, 305동 120
2호(쌍용하나빌리지)
김민지
울산광역시 동구 녹수12길 30, 4동 102호(전하동,
현대3단지아파트)
강상욱
울산광역시 남구 옥현로 92-12, 206동 102호(무거
동, 옥현주공2단지아파트)
- (74) 대리인
특허법인태백

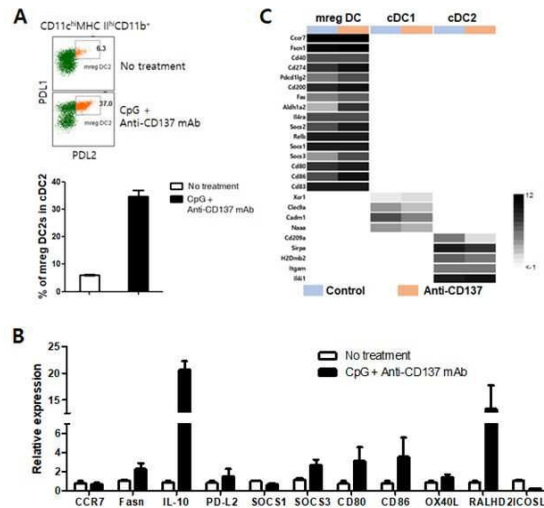
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 면역 조절 분자가 풍부한 성숙 수지상 세포의 분화 방법

(57) 요약

본 발명은 면역 조절 분자가 풍부한 성숙 수지상 세포(mreg DC)의 분화 방법에 관한 것으로, in vitro 및 in vivo에서 면역 조절 분자가 풍부한 성숙 수지상 세포(mreg DC)를 증식시키기 위해 비장세포에서 수집된 CD11b⁺ 수지상세포에 항 CD137 항체를 처리하여 CD11c^{hi} MHC II^{hi} CD11b⁺ 인 cDC2에서 PDL1과 PDL2가 동시에 발현되는 제 2형 mreg DC가 분화되는 것을 확인함으로써, 항 CD137 항체를 이용하여 mreg DC를 증식시키는 방법 및 상기 방법을 이용하여 증식된 mreg DC를 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 11/06 (2018.01)

A61P 17/00 (2018.01)

A61P 29/00 (2018.01)

A61P 37/06 (2018.01)

C12N 2501/056 (2013.01)

C12N 2501/998 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711130495
과제번호	2020M3A9D3037891
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오·의료기술개발(R&D)
연구과제명	수지상세포 기반 음성 되먹임 면역제어 기술 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	울산대학교
연구기간	2020.06.01 ~ 2025.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

수지상 세포에 항 CD137 항체 및 CpG를 처리하는 단계를 포함하는 면역 조절 분자가 풍부한 성숙 수지상 세포(mreg DC)의 분화 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 수지상 세포는 CD8⁻/CD11b⁺ 수지상 세포인 것을 특징으로 하는 증식 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 mreg DC는 7AAD⁻ CD11c^{hi} MHC II^{hi} CD11b⁺ 인 mreg DC 제2형 세포인 것을 특징으로 하는 증식 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 mreg DC는 PDL1 및 PDL2가 동시에 발현되는 세포인 것을 특징으로 하는 증식 방법.

청구항 5

대상체에 항 CD137 항체를 투여하는 단계를 포함하는 면역 조절 분자가 풍부한 성숙 수지상 세포(mreg DC)를 in vivo에서 분화 방법.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 분화 방법에 따라 분화된 면역 조절 분자가 풍부한 성숙 수지상 세포(mreg DC)를 유효성분으로 포함하는 염증질환의 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 염증질환은 이식편대숙주병, 장기이식거부반응, 자가면역질환, 천식, 아토피 및 만성염증 질환으로 구성된 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 면역 조절 분자가 풍부한 성숙 수지상 세포(mature dendritic cell enriched in immunomodulatory molecules, mreg DC)의 분화 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 이식편대숙주 질환 (Graft Versus Host Disease)은 동종 간의 골수 이식이나 말초혈액 조혈모세포 이식, 면역력 저하 등의 이유로 진행된 수혈 등의 치료행위를 통하여 숙주 내로 유입된 타인의 면역세포인 T 림프구가 숙주가 면역 기능이 저하된 경우에는 숙주의 면역체계에 의하여 사멸되지 않고 숙주의 체내에서 증식하여 림프구가 환자의 세포를 비자기(non-self)로 인식하여 숙주를 공격하는 병으로, 증상의 정도에 따라 심한 경우 사망에 이르기까지 하는 질환이다. 이식편대 숙주 질환의 원인은 크게 2가지로 나뉘는데, 숙주의 면역력 약화와 가족의 혈액 수혈이다. 이식편대숙주질환은 급성과 만성으로 구분하며, 시술 후 100일 이전에 발생하면 급성, 100일 이후에 발생하면 만성으로 분류된다.

[0003] 이식편대숙주질환은 급성으로 오는 경우가 대부분이며 이식편에 포함된 T세포가 숙주세포에 존재하는 특이 항원에 대하여 반응을 나타내고 여러 가지 증상을 일으키는데, 발생하는 증상으로는 감염, 사이토메갈로바이러스로 인한 폐렴, 간염, 위장관염이 있다. 피부병변으로 홍역과 비슷한 피부의 발진이 생기는데 주로 귓바퀴, 손바닥,

발바닥에 발생하므로 다른 피부질환과 차이가 있다. 피부질환과 함께 간질환이 동반되어 황달이 발생하고 간수치가 증가한다. 위장관에 문제가 있는 경우 구역, 구토, 식욕부진, 복통 및 설사증상이 있다. 현재까지 이식편 대숙주질환의 근본적인 치료방법은 없으며 증상을 완화시킬 수 있는 치료만 가능하고, 스테로이드요법이 효과적인 치료로 사용되고 있다.

[0004] 한편 수지상세포는 1868년 랑겔한스(Langerhans)에 의해 피부에서 처음 발견되었으며 1973년 칸(Cohn)과 스테인만(Steinmann)에 의해 면역보조 세포로 기능이 알려지게 되었다. 그리고 1990년대에는 강력한 항원제시세포(professional antigen presenting cells; APC)로 기능이 밝혀지면서 면역유도 및 면역조절에서의 중요한 역할을 담당한다는 것을 알게 되었다. 인체 내의 수지상세포는 전체 순환 백혈구의 단지 약 0.3%를 차지할 뿐이지만 대식세포와는 구별되는 표현형을 지닌 이질적인 집단으로 구성되어 있다. 수지상세포는 비교적 약한 항원제시능력을 지닌 B세포나 대식세포와는 달리 강력한 항원제시세포라는 점에서 차별화된다. 수지상세포는 항원과 접한 적이 없는 원시 T세포(naive T cell)를 자극시킬 수 있는 일차면역반응(primary immune response) 유도 능력을 지니며, 또한 면역기억을 유도할 수 있는 특성을 갖는 유일한 면역세포이다. 수지상세포가 강력한 면역반응 활성화 기능을 할 수 있는 것은 항원제시세포(APC, Antigen Presenting Cell)로서 세포 표면에 MHC 분자(I/II)뿐만 아니라, 보조자극분자(co-stimulatory molecules) 예컨대, CD-80 및 CD-86와 부착 분자(adhesion molecule) 예컨대, ICAM-1들을 고농도로 발현하고 있으며, 여러 가지의 사이토카인(cytokine, IFN-alpha, IL-12, IL-18 등)을 분비하기 때문인 것으로 알려져 있다. 수지상세포는 세포 표면에 항원제시분자들(MHC 분자와 보조자극 분자들)을 많이 발현하고 있고, IFN-알파, IL-12 등 여러 가지 사이토카인을 분비하기 때문에 항원 특이 세포살해 T 세포의 생성, Th1 세포의 증식 및 활성화를 유도할 수 있다고 알려져 있다.

[0005] 이와 같이, 수지상세포(dendritic cell)는 가장 강력한 항원 전달 세포(Antigen presenting cells)로서, 생체 내 극히 적은 수로 존재하지만 T세포 면역을 조절하는 기능이 매우 뛰어나기 때문에 특이 항원에 대한 면역을 유도하기 위한 임상 연구에서 암 또는 감염 질환의 치료제로서 연구되고 있다. 조직 또는 혈액으로부터 분리된 수지상세포를 in vitro에서 항원으로 자극시킨 후 성숙한 수지상세포 형태로 in vivo에 다시 주입하는 경우, 면역원성을 나타내는 것으로 확인되어, 암 또는 병원균의 특이 항원에 대한 면역을 유도하기 위한 세포 백신으로서 그 응용 가치가 매우 크다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국공개특허공보 제10-2013-0023797호 (2013. 03. 08. 공고)

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) Nature, 580(7802), 257-262. (2020. 03. 25. 공고)

(비특허문헌 0002) Immunity, 52(6), 942-956. (2020. 06. 16. 공고)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 항-CD137 항체를 이용하여 강력한 면역 억제능을 나타내는 mregDC(mature dendritic cell enriched in immunomodulatory molecules)를 증식시키는 방법 및 이를 포함하는 염증질환의 치료제를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 수지상 세포에 항 CD137 항체 및 CpG를 처리하는 단계를 포함하는 면역 조절 분자가 풍부한 성숙 수지상 세포(mreg DC)의 분화 방법을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 대상체에 항 CD137 항체를 투여하는 단계를 포함하는 면역 조절 분자가 풍부한 성숙 수지상 세포(mreg DC)를 in vivo에서 분화 방법을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 분화 방법에 따라 분화된 면역 조절 분자가 풍부한 성숙 수지상 세포(mreg DC)를 유효성분으로 포함하는 염증질환의 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명에 따르면, in vitro 및 in vivo에서 면역 조절 분자가 풍부한 성숙 수지상 세포(mreg DC)를 증식시키기 위해 비장세포에서 수집된 CD11b⁺ 수지상세포에 항 CD137 항체를 처리하여 CD11c^{hi} MHC II^{hi} CD11b⁺ 인 cDC2에서 PDL1과 PDL2가 동시에 발현되는 제2형 mreg DC가 분화되는 것을 확인함으로써, 항 CD137 항체를 이용하여 mreg DC를 증식시키는 방법 및 상기 방법을 이용하여 증식된 mreg DC를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 in vitro에서 mreg DC(mature dendritic cell enriched in immunomodulatory molecules, 면역 조절 분자가 풍부한 성숙 수지상 세포)를 증식한 것을 확인하기 위해, FACS(Fluorescence-Activated Cell Sorting) 분석(A), mreg DC 관련 유전자 발현(B) 및 RNA seq으로 항 CD137에 의해 조절되는 유전자(C)를 분석한 결과이다.

도 2는 in vivo에서 mreg DC(mature dendritic cell enriched in immunomodulatory molecules, 면역 조절 분자가 풍부한 성숙 수지상 세포)를 증식한 것을 확인하기 위해, FACS(Fluorescence-Activated Cell Sorting) 분석한 결과이다.

도 3은 만성 이식편대숙주병(GVHD) 모델에서 mreg DC(mature dendritic cell enriched in immunomodulatory molecules, 면역 조절 분자가 풍부한 성숙 수지상 세포)의 치료 효능을 확인하기 위해, 비장세포의 수(A), 간 또는 대장의 병증(B) 및 자가항체의 변화(C)를 분석한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 명세서에서 사용되는 용어는 본 발명에서의 기능을 고려하면서 가능한 현재 널리 사용되는 일반적인 용어들을 선택하였으나, 이는 당 분야에 종사하는 기술자의 의도 또는 관례, 새로운 기술의 출현 등에 따라 달라질 수 있다. 또한, 특정한 경우는 출원인이 임의로 선정한 용어도 있으며, 이 경우 해당되는 발명의 설명 부분에서 상세히 그 의미를 기재할 것이다. 따라서 본 발명에서 사용되는 용어는 단순한 용어의 명칭이 아닌, 그 용어가 가지는 의미와 본 발명의 전반에 걸친 내용을 토대로 정의되어야 한다.

[0015] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0016] 수치 범위는 상기 범위에 정의된 수치를 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최대의 수치 제한은 낮은 수치 제한이 명확히 쓰여 있는 것처럼 모든 더 낮은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최소의 수치 제한은 더 높은 수치 제한이 명확히 쓰여 있는 것처럼 모든 더 높은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 수치 제한은 더 좁은 수치 제한이 명확히 쓰여 있는 것처럼, 더 넓은 수치 범위 내의 더 좋은 모든 수치 범위를 포함할 것이다.

[0017] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0018] 본 발명은 수지상 세포에 항 CD137 항체 및 CpG를 처리하는 단계를 포함하는 면역 조절 분자가 풍부한 성숙 수지상 세포(mreg DC)의 분화 방법을 제공한다.

[0019] 상기 수지상 세포는 CD8⁻/CD11b⁺ 수지상 세포이고, 상기 mreg DC는 7AAD⁻ CD11c^{hi} MHC II^{hi} CD11b⁺ 인 mreg DC 제2형 세포이며, 상기 mreg DC는 PDL1 및 PDL2가 동시에 발현되는 세포이다.

[0020] 상기 면역 조절 분자가 풍부한 성숙 수지상 세포(mature dendritic cell enriched in immunomodulatory molecules, mreg DC)는 면역 조절 유전자(Cd274, Pcd11lg2 및 Cd200) 및 성숙 유전자(Cd40, Ccr7 및 I112b)를 공동으로 발현하는 조절 수지상 세포(Regulatory dendritic cell)이다. mregDC는 조절 CD4⁺ T 세포의 생성을 유도하여 면역을 억제한다. mregDC 분화는 Axl과 IL-4가 관여하며 IL-4를 중화시키면 중양의 성장을 감소시킬 수 있다.

- [0021] 또한, 본 발명은 대상체에 항 CD137 항체를 투여하는 단계를 포함하는 면역 조절 분자가 풍부한 성숙 수지상 세포(mreg DC)를 in vivo에서 분화 방법을 제공한다.
- [0022] 상기 대상체는 인간을 제외한 포유류를 의미하며, 예컨대 마우스일 수 있다.
- [0023] 또한, 본 발명은 상기 분화 방법에 따라 분화된 면역 조절 분자가 풍부한 성숙 수지상 세포(mreg DC)를 유효성 분으로 포함하는 염증질환의 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0024] 상기 염증질환은 이식편대숙주병, 장기이식거부반응, 자가면역질환, 천식, 아토피 및 만성염증질환으로 구성된 군에서 선택된 어느 하나이다.
- [0025] 본 발명의 약학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다.
- [0026] 상기 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸 히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0027] 본 발명에 있어서, 상기 약학적 조성물에 포함되는 첨가제의 함량은 특별히 한정되는 것은 아니며 통상의 제제화에 사용되는 함량 범위 내에서 적절하게 조절될 수 있다.
- [0028] 본 발명의 약학적 조성물은 제형화를 위해 추가로 있는 약제학적으로 허용가능한 담체 및 희석제를 포함할 수 있다. 상기 약제학적으로 허용가능한 담체 및 희석제는 전분, 당, 및 만니톨과 같은 부형제, 칼슘 포스페이트 등과 같은 충전제 및 증량제, 카르복시메틸셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스 등과 같은 셀룰로오스 유도체, 젤라틴, 알긴산염, 및 폴리비닐 피롤리돈 등과 같은 결합제, 활석, 스테아린산 칼슘, 수소화 피마자유 및 폴리에틸렌 글리콜과 같은 윤활제, 포비돈, 크로스포비돈과 같은 붕해제, 폴리소르베이트, 세틸알코올, 및 글리세롤 등과 같은 계면활성제를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 약제학적으로 허용가능한 담체 및 희석제는 대상체에게 생물학적 및 생리학적으로 친화적인 것일 수 있다. 희석제의 예로는 염수, 수용성 완충액, 용매 및/또는 분산제(dispersion media)를 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0029] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있다. 경구 투여일 경우, 정제, 트로키제 (troches), 로젠지 (lozenge), 수용성 현탁액, 유성 현탁액, 조제 분말, 과립, 에멀전, 하드 캡슐, 소프트 캡슐, 시럽 또는 엘릭시르제 등으로 제형화될 수 있다. 비경구 투여일 경우, 주사액, 좌제, 등으로 제형화 될 수 있다.
- [0030] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 환자의 상태 및 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이 체질 특이성, 제제의 성질, 질병의 정도, 조성물의 투여시간, 투여방법, 투여기간 또는 간격, 배설율, 및 약물 형태에 따라 그 범위가 다양할 수 있으며, 이 분야 통상의 기술자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 예컨대, 약 0.1 내지 10,000 mg/kg의 범위일 수 있으나 이제 제한되지 않으며, 하루 일회 내지 수회에 나누어 투여될 수 있다.
- [0031] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.
- [0032] **실시예 1. In vitro에서 mreg DC2 증식**
- [0033] In vitro에서 mreg DC(mature dendritic cell enriched in immunomodulatory molecules, 면역 조절 분자가 풍부한 성숙 수지상 세포)를 증식시키기 위해서 CD11b+ 비장수지상세포를 분리하였다. Collagenase IV/DNase I을 이용하여 C57BL/6 야생형 마우스로부터 비장세포를 수집하고, CD8 마이크로비드가 결합된 depletion column인 LD 컬럼을 사용하여 negative selection으로 CD8+ 수지상세포를 제거하였다. 추출물을 CD11c 마이크로비드와 LS 컬럼을 이용하여 positive selection으로 CD11b+ 비장 수지상세포를 분리하였다.
- [0034] L-glutamin(6mM), NEAA(0.2mM), 2-mecaptoethanol(25 mM), 및 FLT3L(FMS-like tyrosine kinase 3 ligand) (10 ng/ml)이 포함된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's medium) 배지에 분리된 CD11b+ 비장 수지상세포를 현탁하

고 배양하였다. 항 CD137 항체를 10 ug/ml로 48 plate에 처리 후, 4°C o/n 동안 항체를 pate 바닥에 부착시켰다. 12 시간 후 항체 용액을 제거하였다. 배양된 세포를 No treatment well 또는 항 CD137 항체 부착시킨 well에 각각 2×10^6 cells/ml로 분주하였다. 동시에 항 CD137 항체 처리된 well에 CpG를 추가한 후, 37°C 5% CO₂ 조건의 동물세포 배양기에서 24 시간 또는 48 시간 동안 배양하여 mreg DC2로 분화 배양하였다.

[0035]

배양된 세포의 mreg DC2 유전형질을 확인하기 위해, 24 시간 배양된 각각의 수지상세포를 회수하고 세포를 Trizol solution을 사용하여 제조사의 지침에 따라 total RNA를 추출하였다. 추출한 total RNA 1 ug를 cDNA 합성 kit (Promega)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 real time PCR을 이용하여 조절 유전자(CCR7, Fasn, IL-10, PD-L2, SOC S1, SOC S3, CD80, CD86, OX40L, RALHD 및 2ICOSL)의 발현을 확인하였다. 사용한 프라이머는 하기 표 1과 같다. 추가로 RNA sequencing은 No treatment 와 항-CD137 항체 처리 그룹에서 추출한 total RNA 1 ug를 사용하여 수행하였다.

표 1

[0036]

유전자		염기서열 (5' → 3')	서열번호
CCR7	F	AAA GCA CAG CCT TCC TGT GT	1
	R	GAC CTC ATC TTG GCA GAA GC	2
Fasn	F	CTA CAG CAT CGA CGC CAG TC	3
	R	TTC CAC ACC AGG CAC AGG TA	4
IL-10	F	AGG GTT ACT TGG GTT GCC AA	5
	R	CAC AGG GGA GAA ATC GAT GA	6
PD-L2	F	GTA CCG TTG CCT GGT CAT CT	7
	R	GCC AGG ACA CTT CTG CTA GG	8
SOC S1	F	AGT CGC CAA CGG AAC TGC TTC TT	9
	R	ACG TAG TGC TCC AGC TCG AAA	10
SOC S3	F	GGG TGG CAA AGA AAA GGA G	11
	R	GTT GAG CGT CAA GAC CCA GT	12
CD80	F	GCT GCT GAT TCG TCT TTC ACA A	13
	R	CGG CAA GGC AGC AAT ACC T	14
CD86	F	ACT TAC GGA AGC ACC CAC GAT	15
	R	CCA CGG AAA CAG CAT CTG AGA	16
OX40L	F	TGC AGA GAT GGA AGG GGA AG	17
	R	AGA GAG TTG CAG GCA GAC AT	18
RALHD	F	GAC TTG TAG CAG CTG TCT TCA CT	19
	R	TCA CCC ATT TCT CTC CCA TTT CC	20
2ICOSL	F	GTG CTG CGT AGA GAA TGT GG	21
	R	GCT GTA CAG TCT TGG GTC CT	22

[0037]

또한, 배양된 세포의 mreg DC2 표현형을 확인하기 위해, 48 시간 배양된 세포를 2.4G2 (10 ug/ml) 항체로 4°C 조건에서 10분 동안 Fc blocking 하였다. 이후 세포를 CD11c-PE-cy7, MHC II-APCcy7, CD11b-FITC, PDL-2-PE, 및 PDL-1 APC 항체로 4°C 조건에서 15분 동안 염색하였다. FACS(Fluorescence-Activated Cell Sorting) loading 5분전에 7AAD (5ul/106 cell; biolegend)를 처리하여 FACS 분석시 죽은 세포와 살아있는 세포를 구분하는데 이용하였다. mreg DC2는 살아있는 세포(7AAD⁻)에서 CD11c^{hi} MHC II^{hi} CD11b⁺ 인 cDC2에서 PDL1과 PDL2가 동시에 발현하는 세포로 특정하였다.

[0038]

도 1에 나타난 바와 같이, 비장의 DC2를 항 CD137 항체와 CpG로 자극하는 조건에서 2일 동안 배양하면 mregDC의 표식인자를 가진 세포가 생성된다.

[0039]

실시예 2. In vivo에서 mreg DC2 증식

[0040]

In vivo에서 mreg DC를 증식시키기 위해, 만성 이식편대숙주병(Graft-versus-host disease, GVHD) 모델(DBA to BDF1)에서 mreg DC를 유도 분화하였다. 물리적으로 추출한 DBA2 생쥐의 비장세포를 8×10^7 cells/mice로 BDF1 생쥐에 정맥 주사하였다. 이와 동시에 PBS(대조군) 또는 200 ug의 항 CD137 항체를 각 그룹 당 5 마리씩 복강에 주사하였다. 주사 5일 후, Collagenase IV/DNase I을 이용하여 각각의 마우스로부터 비장세포를 회수하고, 2.4G2 (10 ug/ml) 항체로 4°C에서 10분 동안 반응시킨 후, CD11c-PE-cy7, MHC II-APCcy7, CD11b-FITC, PDL-2-

PE, 그리고 PDL-1 APC 항체로 4℃에서 15분 동안 염색하였다. FACS loading 5분전에 7AAD (5ul/106 cell; biolegend)를 처리하였다. mreg DC2는 살아있는 세포(7AAD⁻)에서 CD11c^{hi} MHC II^{hi} CD11b⁺ 인 cDC2에서 PDL1과 PDL2가 동시에 발현하는 세포로 FACS를 이용하여 분석하였다.

[0041] 도 2에 나타난 바와 같이, 만성 이식편대숙주질환을 유도할 때 항-CD137 항체를 주사하면 시험관에서 생성된 것과 동일한 mregDC의 표현형을 가진 DC가 증식한다. 그 결과 항 CD137 항체를 주사 맞은 생쥐에서 만성 이식편대숙주병 발생이 억제된다.

[0042] **실시예 3. mreg DC2에 의한 GVHD 억제**

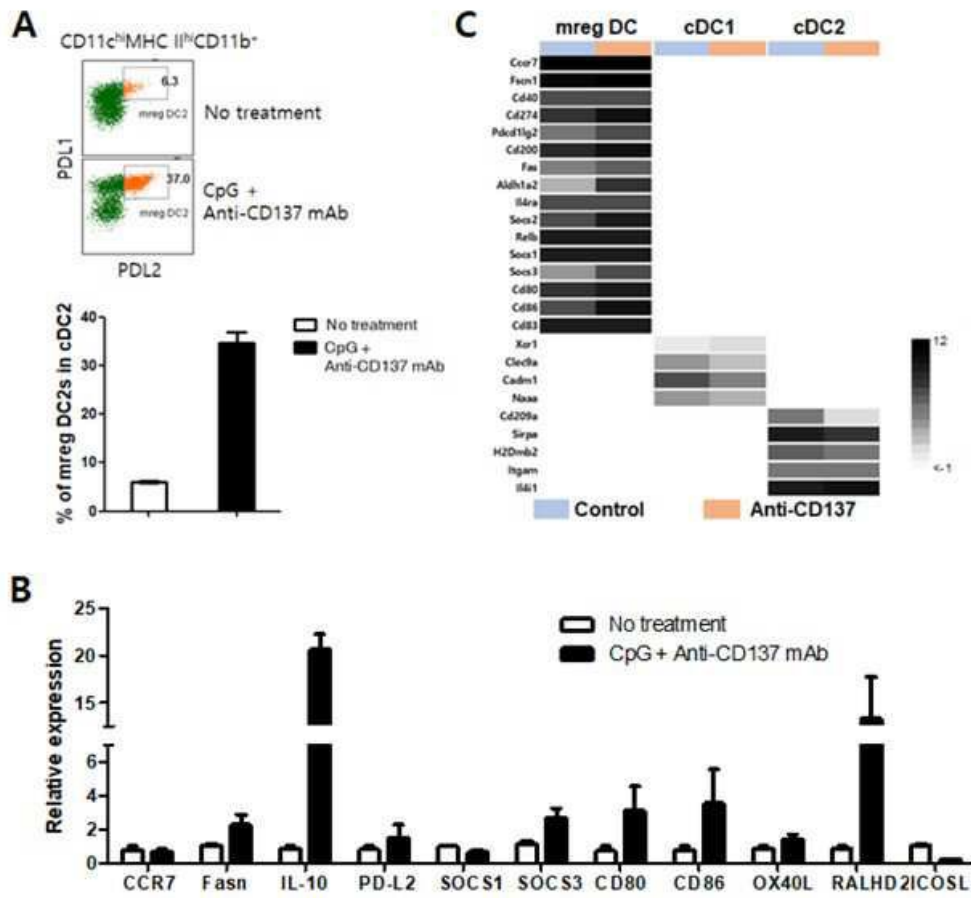
[0043] 상기 실시예 1 및 2로 증식된 mreg DC2가 만성 이식편대숙주병(GVHD) 모델(BM12 to C57BL/6)에서 치료 효능을 나타내는지 확인하였다. 물리적으로 추출한 BM12 마우스의 비장세포를 8×10^7 cells/mice로 야생형 마우스 C57BL/6 또는 CD137^{-/-} 마우스에 정맥 주사하였다. 5 시간 후, 야생형 마우스 C57BL/6의 CD11b⁺ 비장 수지상세포를 CpG + anti-CD137 mAb로 24 시간 동안 처리하고, 이 세포를 5×10^5 cells/mice 로 GVHD가 유도된 야생형 생쥐 또는 CD137^{-/-} 생쥐에 각각 정맥 주사하였으며, 이들을 AT-WT 또는 AT-CD137^{-/-} 라 명명하였다. GVHD 유도 후 14일 뒤, 각 그룹에서 비장, 간, 대장, 및 혈청을 회수하여 GVHD가 억제되었는지 확인하였다.

[0044] 도 3에 나타난 바와 같이, mreg DC2 주사된 그룹이 대조군에 비해 비장 세포 수의 증가, 간에서 질병정도(염증)의 감소, 그리고 혈청에서 자가항체 감소 등이 나타나는 것을 확인함으로써, mreg DC2 세포가 이식편대숙주병의 증상을 억제시키는 효과가 있음을 확인하였다.

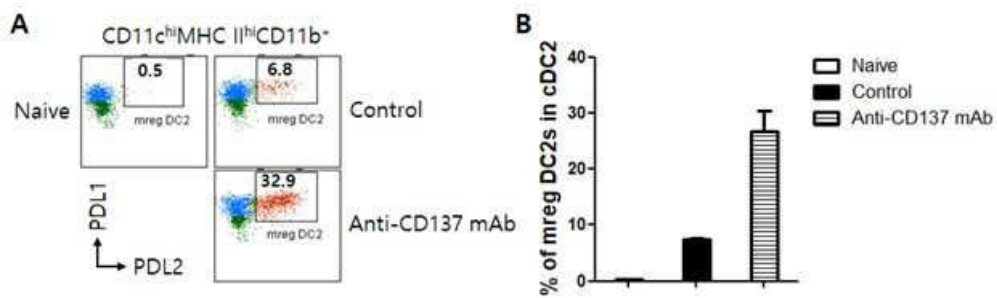
[0045] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 즉, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다.

도면

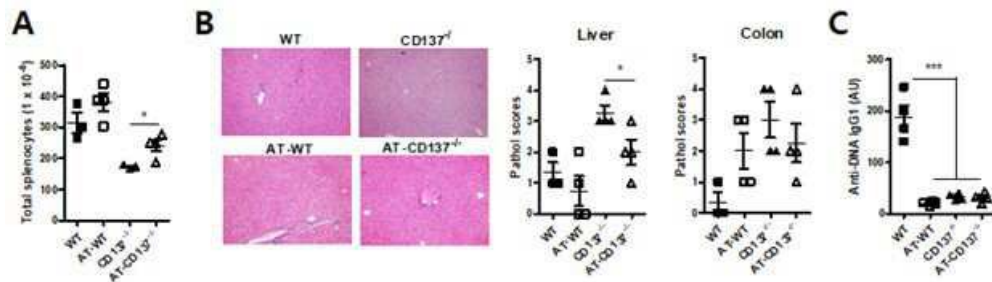
도면1



도면2



도면3



서열 목록

<110> University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation

<120> Differentiation method of mature dendritic cell enriched in immunomodulatory molecules

<130> ADP-2021-0090

<160> 22

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CCR7_f

<400> 1

aaagcacagc cttcctgtgt

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CCR7_r

<400> 2

gacctcatct tggcagaagc

20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fasn_f

<400> 3

ctacagcatc gacgccagtc	20
<210> 4	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Fasn_r	
<400> 4	
ttccacacca ggcacaggta	20
<210> 5	
<211> 20	
<212> DNA	
<213>	
> Artificial Sequence	
<220><223> IL-10_f	
<400> 5	
agggttactt gggttgccaa	20
<210> 6	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> IL-10_r	
<400> 6	
cacaggggag aaatcgatga	20
<210> 7	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PD-L2_f	
<400> 7	
gtaccgttgc ctggtcatct	20
<210> 8	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223>	PD-L2_r	
<400>	8	
gccaggacac	ttctgctagg	20
<210>	9	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	SOC S1_f	
<400>	9	
agtcgccaac	ggaactgctt ctt	23
<210>	10	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	SOC S1_r	
<400>	10	
acgtagtgtc	ccagctcgaa a	21
<210>	11	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	SOC S3_f	
<400>	11	
gggtggcaaa	gaaaaggag	19
<210>	12	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	SOC S3_r	
<400>	12	
gttgagcgtc	aagacccagt	20
<210>	13	
<211>	22	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD80_f

<400> 13

gctgctgatt cgtctttcac aa

22

<210> 14

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD80_r

<400> 14

cggcaaggca gcaatacct

19

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD86_f

<400> 15

acttacggaa gcacccacga t

21

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD86_r

<400> 16

ccacggaaac agcatctgag a

21

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OX40L_f

<400> 17

tgacagatg gaaggggaag

20

<210> 18

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> OX40L_r
 <400> 18
 agagagttgc aggcagacat 20
 <210> 19
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RALHD_f
 <400> 19
 gacttgtagc agctgtcttc act 23

 <210> 20
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RALHD_r
 <400> 20
 tcacccattt ctctccatt tcc 23
 <210> 21
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 2ICOSL_f
 <400> 21
 gtgctgcgta gagaatgtgg 20
 <210> 22
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 2ICOSL_r
 <400> 22
 gctgtacagt cttgggtcct 20