



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0138294
(43) 공개일자 2017년12월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0786 (2010.01) A61K 38/16 (2006.01)
C07K 14/35 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0645 (2013.01)
A61K 38/164 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0070510
(22) 출원일자 2016년06월07일
심사청구일자 2016년06월07일
기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
김화중
대전광역시 중구 서문로 96, 208동 2104호(문화동, 센트럴파크2단지아파트)
최한규
대전광역시 서구 관저북로 52, 107동 1304호(관저동, 대자연마을아파트)
(74) 대리인
특허법인충정

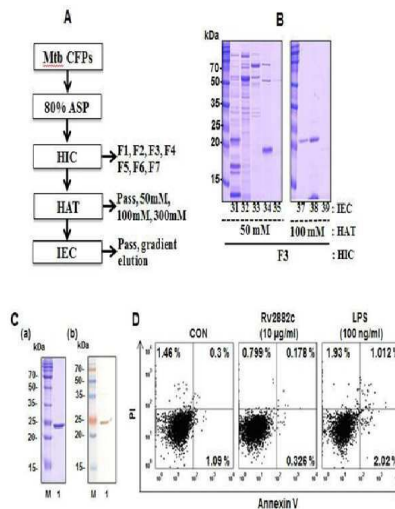
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 Rv2882c 단백질을 포함하는 대식세포의 활성화 조성물

(57) 요약

본 발명은 결핵균의 Rv2882c 단백질을 유효성분으로 포함하는 대식세포의 활성화 조성물에 관한 것이다. 또한 본 발명은 결핵균의 Rv2882c 단백질을 비활성화된 대식세포에 처리하여 대식세포를 활성화시키는 방법에 관한 것이다. 또한 상기의 대식세포의 활성화 조성물을 포함하는 면역 증강용 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07K 14/35 (2013.01)

C12N 2501/998 (2013.01)

(72) 발명자

최승아

대전광역시 유성구 은구비남로33번길 5, 1407호(지
축동, 경남아너스빌2)

백용우

대전광역시 서구 구봉산북로 212, 101동 502호(관
저동, 관저5엘에이치천년나무)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013R1A2A1A03069903

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 다제내성 결핵을 표적으로 하는 치료백신 개발연구

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교

연구기간 2013.12.01 ~ 2016.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

Rv2882c 단백질을 유효성분으로 포함하는 대식세포의 활성화 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 Rv2882c 단백질은 결핵균(M.tuberculosis)유래의 단백질인 것을 특징으로 하는 대식세포의 활성화 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 Rv2882c 단백질은 1 $\mu\text{g/ml}$ 내지 20 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 포함된 것을 특징으로 하는 대식세포의 활성화 조성물.

청구항 4

대식세포에 Rv2882c를 처리하여 활성화시키는, 대식세포 활성화 유도 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 Rv2882c 처리 후 세포를 12시간 이상 36시간 이하로 배양하는 것을 특징으로 하는 대식세포 활성화 유도 방법.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 Rv2882c 단백질은 대식세포를 활성화시키는 과정 동안 TNF- α , IL-6, IL-12 및 MCP-1로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 생성을 증가시키는 것을 특징으로 하는, 대식세포의 활성화 유도 방법.

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 Rv2882c 단백질은 1 $\mu\text{g/ml}$ 내지 20 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 포함된 것을 특징으로 하는 대식세포의 활성화 유도 방법.

청구항 8

제4항에 있어서, 상기 대식세포의 활성화는 Rv2882c가 TLR(toll-like receptor)-4를 자극하여 일어나는 것을 특징으로 하는 대식세포의 활성화 유도 방법.

청구항 9

제4항에 있어서, 상기 대식세포의 활성화는 미토젠-활성화 단백질키나제(MAPK) 및 NF- κB 을 자극하여 일어나는 것을 특징으로 하는 대식세포의 활성화 유도 방법.

청구항 10

제4항에 있어서, 상기 대식세포는 CD(Cluster of Differentiation)80, CD86, MHC(Major Histocompatibility Complex)-클래스 I, II에 대하여 양성의 면역학적 특성을 나타내는 것을 특징으로 하는 대식세포의 활성화 유도 방법.

청구항 11

제1항 또는 제2항의 조성물을 포함하는 면역 증강용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 대식세포의 활성화 조성물 및 대식세포를 활성화 시키는 방법에 관한 것이다. 더욱 구체적으로는 결핵균(*M.tuberculosis*) 유래의 Rv2882c 단백질을 유효성분으로 포함하는 대식세포 활성화 조성물 및 이를 이용하여 비활성화된 대식세포를 활성화시키는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 결핵(Tuberculosis, TB)은 결핵균 및 다른 마이코박테리움(*Mycobacterium*)종의 감염에 의해 유발되는 만성 감염성 질병이다. TB는 매년 약 8백만명의 신규 감염자가 발생되며 2백만명의 목숨을 앗아가는 개발도상국의 주요 질병이며, 또한 선진국에서도 문제점으로 부각되고 있다. 상당한 기간 동안 감염은 무증상일 수 있으나, 결핵은 가장 공통적인 증상으로서 폐의 급성 염증을 나타내며, 그 결과 발열 및 마른 기침(nonproductive cough)을 유발시킨다. 치료하지 않으면, 일반적으로 심각한 합병증 및 사망을 초래한다.

[0003] TB는 장기간에 걸친 항생제 요법을 이용하여 치료될 수 있으나, 이러한 치료법이 결핵의 확산을 막기에는 역부족이다. 감염된 개체들은 증상을 나타내지는 아니하나, 일정 기간 보균상태(contagious)일 수 있다. 게다가 치료 섭생을 엄격하게 따르더라도 환자의 행동을 통제하는 것은 어렵다. 일부 환자들은 치료과정을 끝마치지 못하는데, 이는 효험없는 치료와 약제 내성의 발달을 초래할 수 있다. 나아가 이러한 약물 내성 변종의 출현이 TB 제어를 복잡하게 만들었다. 하지만, 사용되고 있는 유일한 백신인 미코박테리움 보비스 바실러스 칼메테-구에린(BCG)는 유아기의 가장 심각한 형태의 TB은 예외로 하고, 폐TB로 부터 유효하게 예방할 수 없다. 다양한 새로운 TB 백신이 개발 중이나, 잠재적으로 감염된 개인과 성인에게 안전하고 효과적인 백신이 여전히 시급히 필요하다. 따라서, 결핵균(*Mtb*)에 대한 면역력을 유도할 수 있는 다양한 미코박테리아 항원의 확인과 정의는 병원체 숙주 상호작용을 좀 더 잘 이해할 수 있게 하며 효과적인 백신 개발을 용이하게 할 수 있다.

[0004] 대식세포는 미코박테리아에 대한 첫 번째의 방어선이다. 대식세포는 선천 면역과 적응 면역을 연결시키는데 중요하고 *Mtb*가 생존하는 세포이기도 하다. 미코박테리아 감염 후, 대식세포는 *Mtb*를 인식하여 탐식한다. 이러한 반응은 세균의 세포내 성장을 제어하기 위한 수용성 항균성 및 선천성 면역 매개체 분비와 같은 복잡한 과정을 개시한다. 특히, *Mtb* 혹은 그 성분에 의해 활성화된 대식세포는 케모카인과 사이토카인, 가장 중요한 종양 괴사 인자- α (TNF- α), 인터류킨-1 패밀리를 (IL-1 β , IL-18)와 IL-12의 사이토카인을 분비하여 림프구 활성화와 보충을 촉진하고 궁극적으로 육아종 형성을 유도한다. 미코박테리아나 미코박테리아 단백질은 주로 면역 세포에서 발현되는 톨-유사 수용체(TLR)에 의해 인식된다. TLR와 특정 미코박테리아 성분의 상호작용 후, 어댑터 분자 골수 분화 일차 반응 단백질 88 (MyD88)이 중요한 역할을 하는 신호전달 경로가 촉발된다. 또한, 미토겐 활성화 단백질 키나제 (MAPK)와 NF- κ B는 TLR 신호 전달 캐스케이드에 의해 활성화된다. 이러한 TLR2 또는 TLR4 매개 캐스케이드를 통해 다양한 미코박테리아 단백질이 대식세포 또는 수지상 세포의 활성화를 유도하는 것으로 보고되어 있다. 수지상 세포는 T 세포 반응을 개시하는데 필요한 주요 세포로 널리 인정되고 대식세포는 면역반응의 작용 단계에 중요하다. 대식세포를 활성화하여 전염증성 사이토카인을 분비하는 몇몇의 미코박테리아 단백질이 규명되어 있지만, 이러한 미코박테리아 단백질의 TB에 대한 숙주 방어기전에서 이러한 단백질의 방어작용에 대해서는 거의 알려진 바가 없다.

[0005] 이번 연구에서 우리는 다차원 분석을 통해 *Mtb* 배양여과액 단백질(CFP)로부터 신규한 대식세포-활성화 미코박테리아 단백질을 확인하였고 그의 면역반응성을 조사하였다. 이에, 새롭게 확인된 Rv2882c 단백질이 대식세포를 활성화하여 전염증성 사이토카인을 분비하도록 하고 CD80 및 CD86 동시 자극 분자와 MHC 클래스 I/II 분자를 TLR4, MyD88 와 TRIF를 통해 발현시킴을 알아냈다. Rv2882c-활성화 대식세포는 효과/기억 T 세포군의 유의한 확산을 유도하였다. 더욱이, 마우스 모델에서 Rv2882c는 BCG 프라임-부스트 백신접종에서 예방효과를 나타내었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2012-0012297호

(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허 제10-2012-0090393호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 결핵균의 경우 병원성 인자들을 분비함으로써 대식세포의 활성화를 방해하는 것으로 알려져 있다. 이는 결핵에 대한 효율적인 치료를 방해하는 문제점이 되어 왔다.
- [0008] 이에 본 발명은 대식세포의 활성화를 유도하는 신규한 미코박테리아 단백질을 사용하여, 기존 약제와 작용기전이 다르고 부작용이 상대적으로 적은 결핵 예방 및 효율적인 치료 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기의 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 Rv2882c 단백질을 유효성분으로 포함하는 대식세포의 활성화 조성물을 제공한다.
- [0010] 또한 본 발명은, 상기 Rv2882c 단백질이 결핵균(M.tuberculosis)유래의 단백질인 것을 특징으로 하는 대식세포의 활성화 조성물을 제공한다.
- [0011] 상기 Rv2882c 단백질은 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 양으로 포함되는 것이 바람직하다.
- [0012] 또한 대식세포에 Rv2882c를 처리하여 활성화시키는, 대식세포 활성화 유도 방법을 제공한다.
- [0013] 상기 방법은 Rv2882c 처리 후 세포를 12시간 이상 36시간 이하로 배양하는 것이 바람직하며 상기 Rv2882c 단백질은 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 양으로 첨가되는 것이 바람직하다.
- [0014] 상기 Rv2882c 단백질은 대식세포를 활성화시키는 과정 동안 TNF- α , IL-6, IL-12 및 MCP-1로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 생성을 증가시키는 것을 특징으로 하는, 대식세포의 활성화 유도 방법을 제공한다.
- [0015] 또한 본 발명에서 상기 대식세포의 활성화는 Rv2882c가 TLR(toll-like receptor)-4를 자극하거나 또는 미토겐-활성화 단백질키나제(MAPK) 및 NF- κB 을 자극하여 일어나는 것을 특징으로 한다.
- [0016] 상기 방법에 의하여 제조된 대식세포는 CD(Cluster of Differentiation)80, CD86, MHC(Major Histocompatibility Complex)-클래스 I, II에 대하여 양성의 면역학적 특성을 나타내는 것을 특징으로 한다.
- [0017] 또한 본 발명은 상기 대식세포의 활성화 조성물을 포함하는 면역 증강용 조성물을 제공하고자 한다.

발명의 효과

- [0018] 이상과 같이 본 발명에 의하면 종래 전혀 알려져 있지 않던 재조합 Rv2882c를 활용하여 대식세포를 활성화시킴으로써 신체의 면역 반응을 효과적으로 활성화시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1A는 재조합 Rv2882c 단백질의 제조 과정에 대한 개략도이며 도 1B는 CFP의 황산 암모늄 침전물을 페닐세파로오스를 사용하여 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC)로 분획한 사진이다.
- 도 1C는 정제된 재조합 단백질 Rv2882c에 마우스 항-His 항체를 사용하여 (a)SDS-PAGE 및 (b)웨스턴 블롯 분석을 수행한 사진이다.
- 도 1D는 BMDM 상에서 Rv2882c의 세포독성 효과를 유동세포분석법으로 분석한 사진이다.
- 도 2A, 2B는 재조합 Rv2882c가 대식세포 활성을 유도하고 대식세포 내에서 전염증성 사이토카인을 자극하였는지를 확인하기 위하여, 1, 5 또는 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 Rv2882c로 24시간 처리된 BMDM의 배양 상청액에서의 사이토카인 수준을 측정한 사진이다.
- 도 2C는 BMDM을 제조하여 유동세포분석법을 사용하여 표면 마커의 발현을 분석한 그래프이다.
- 도 3A, B는 WT, TLR2^{-/-} 및 TLR4^{-/-} 유래 Rv2882c-처리 F4/80⁺-게이팅 BMDM 상 CD80 또는 CD86 수준을 보여주는 막대그래프이다.

도 3C,D는 WT, MyD88^{-/-} 및 TRIF^{-/-} 마우스 유래 Rv2882c-처리 F4/80⁺-케이팅 BMDM 상의 CD80 또는 CD86 발현 수준을 보여주는 막대그래프이다.

도 3E는 WT, TLR2^{-/-} 또는 TLR4^{-/-} 마우스 유래 BMDM에 Rv2882c-처리하여 TLR4와 Rv2882c가 결합함을 증명한 그림이다.

도 3F는 항-His 항체로 면역침강(IP)과 항-TLR2 또는 -TLR4 항체로 면역 블롯팅을 나타낸 사진이다.

도 4A는 Rv2882c 10 µg/mL Rv2882c 로 처리된 BMDM에서 시간에 따른 단백질 발현. 세포 용해물에 대한 반응성을 phospho-p38 (p-p38), p38, phospho-ERK1/2 (p-ERK1/2), ERK1/2, phospho-IκB-α (p-IκB-α), IκB-α, phospho-JNK (p-JNK) 및 JNK에 특이한 항체를 사용하여 SDS-PAGE 와 면역 블롯팅으로 분석한 사진이다.

도 4B는 BMDM을 10 µg/mL Rv2882c로 24시간 동안 처리하기 전에 p38 (SB203580, 20 µM), ERK1/2 (U0126, 10 µM) 및 NF-κB (Bay11-7082, 5 µM)의 약학적 억제제나 DMSO (운반체 대조군)으로 1시간 동안 처리하여 대식세포의 활성화 정도의 차이를 나타낸 그래프이다.

도 4C는 배양 배지에서 TNF-α, IL-6 및 MCP-1의 양을 ELISA로 측정된 그래프이다.

도 5A는 세포의 재료 및 제조방법을 나타낸 사진이다.

도 5B,C는 처녀 CD4⁺ T 세포 (CD4⁺CD44⁻CD62L⁺) 및 효과/기억 CD4⁺ T 세포(CD4⁺CD44⁺CD62L⁻)의 수를 유동 세포 계측법으로 측정된 그래프이다.

도 5D,E는 IFN-γ 및 IL-2의 수준을 ELISA에 의해 결정된 그래프이다.

도 6A는 BCG예방 접종에 대한 일정, Rv2882c 부스팅 및 Mtb 챌린지

도 6B는 각 그룹의 폐와 비장 내 세균 하중을 감염 전용 그룹과 대비하여 평균 (±SEM) log₁₀ CFU/기관 (n = 5)값을 나타낸 그래프이다.

도 6C는 비장 및 폐 세포를 각 그룹의 마우스로부터 수확하고, 사이토카인 수준을 ELISA로 분석한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 현재까지 면역세포에 관한 면역반응에 있어서 결핵균(M.tuberculosis)으로부터 유래된 단백질에 관한 많은 연구가 시행되어 왔지만, Rv2882c에 관한 연구는 알려져 있지 않다.

[0021] 대식세포는 외래 병원균에 맞서는 첫 번째 세포이고, 따라서 면역 반응에 중요한 역할을 한다. 특히 활성화된 대식세포는 MHC I형 및 II형 항원을 미숙한 수지상 세포보다 더 높은 수준으로 발현시키고, CD (Cluster of Differentiation) 80+, CD83+, CD86+ 및 CD14-을 조절한다. 더 많은 MHC 발현으로 대식세포의 항원발도의 증가를 유도하는 반면, 동시-자극의 분자 CD80 및 CD86의 상향조절로, T세포 상에 CD28과 같은 동시-자극의 분자 상응물을 통해서 T 세포 활성화 시그널을 강화한다.

[0022] 본 발명의 활성화된 대식세포는 재조합 방법으로 제조된 Rv2882c와 접촉시킴으로써 제조할 수 있다. 본 발명은 Rv2882c를 포함하는 조성물을 통해 대식세포를 활성화시킬 수 있다. 유효한 재조합 방법으로 제조된 Rv2882c는 이에 제한되는 것은 아니나 1 µg/ml 내지 20 µg/ml, 바람직하게는 5 µg/ml 내지 10 µg/ml 농도로 조성물에 포함될 수 있다.

[0023] 대식세포의 활성화는 당해 기술분야에 공지된 방법으로 모니터할 수 있다. 세포 표면 마커를 유세포 분석기 (flow cytometry) 및 면역조직화학법 등과 같은 당해 기술분야에 친숙한 검정으로 검출할 수 있다. 상기 세포들 또한 사이토카인 생성(예 : ELISA, FACS 및 다른 면역 검정)을 통해 모니터 할 수 있다.

[0025] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시 예들은 본 발명을 더욱 쉽게 이해할 수 있도록 예시하는 것으로 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것이 아니다.

[0027] <실시예 1>

[0028] 재료 및 방법

[0029] 1.1 박테리아성 균주, 동물, 감염 및 세포 준비

[0030] 모든 미코박테리아는 0.5% 글리세롤, 0.5% 트윈-80 (Tween-80) (Sigma, St. Louis, MO, USA), 10% 올레산, 알부민, 텍스트로오스와 카탈라아제 (OADC; BD Biosciences, San Jose, CA, USA)가 첨가된 7H9 배지에서 성장시켰다. 무병균 C57BL/6 마우스 (암컷, 6주령)을 Charles River Laboratories (Wilmington, MA)로부터 구입하였고, 5 내지 6주령 C57BL/6J TLR2 녹아웃 (TLR2^{-/-}; B6.129-Tlr2tm1Kir/J) 과 C57BL/10 TLR4 녹아웃 (TLR4^{-/-}; C57BL/10ScNJ) 마우스를 Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA)로부터 구입하였다. 마우스는 한국 대전에 위치한 충남대학교의 의학연구센터 내 생물재해 동물 룸에서 배리어 조건하에서 유지되었다. 자일라진:줄레틸 (9:1)의 혼합물로 마취 후, 마우스를 마우스 페 당 10⁶ CFU의 초기 감염 투여량 H37Ra의 현탁액 50-μL으로 기도내 감염시켰다.

[0031] BMDM는 둘베코 수정 이글 배지 (DMEM) (Welgene Co., Daegu, Korea)로 C57BL/6 마우스의 대퇴골을 통해 씻겨 내려갔다. 적혈구는 실온에서 3분간 RBC 용해 완충액 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)을 가하여 용해시켰다. 세포를 세척하고 단일 세포 현탁액을 제조 후, 총 세포는 10% 소 태아 혈청, 50 ng/mL 마우스 대식세포 콜로니 자극 인자 (M-CSF) 및 1% 항생제 (Welgene)가 포함된 DME에서 현탁시켰다. 그 후 세포를 100-mm 플레이트에 두고 5% CO₂, 37° 에서 7일 동안 배양시켰다. 배양액은 7일의 배양기간 동안 3일 마다 교체하였다.

[0032] 폐를 멸균 조건 하에서 분리, 0.5-cm 조각으로 잘라 5 mL 세포분리 완충액 (0.1% 콜라게나제 형 IV (Worthington Biochemical Corporation, NJ, USA), 1 mM CaCl₂ 및 1 mM MgCl₂을 포함하는 RPMI 배지)에서 37° 에서 15분 동안 교반하였다. 그리고, 폐 세포와 응집체를 둘베코 인산 완충 식염수 (PBS)에서 멸균 1-mL 주사기를 사용하여 40-μm 셀 스트레이너를 통해 여과하였다. 비장은 RPMI 배지(Welgene)에서40-μm 셀 스트레이너 위에 으개졌다. 적혈구는 실온에서 2 분 동안 RBC 용해 완충액을 이용하여 용해시켰다. 고 구배 자기 활성화 세포 분리 (MACS) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany))가 T 세포 서브세트를 분획하기 위해 사용되었다. 세포는 항-마우스 CD4 항체-코팅된 자기 마이크로비드 (Miltenyi Biotec)로 배양된 후 제조업체의 지침에 따라 상자성 컬럼 (LS columns; Miltenyi Biotec) 위에서 양성적으로 선택되었다.

[0034] 1.2 항체 및 시약

[0035] 재조합 M-CSF는 페프로테크 (Rocky Hill, NJ, USA)로부터 구입하였다. 플루오레세인 이소티오시안산염(FITC)-아넥신 V/PI 키트는 BD Biosciences (BD Pharmingen, San Jose, CA)로부터 구입하였다. *E. coli* O111:B4에서 유래한 LPS는 InvivoGen (San Diego, CA, USA)로부터 구입하였다. 에도톡신 필터(END-X)와 에도톡신 제거 수지(END-X B15)는 Associates of Cape Cod (East Falmouth, MA, USA)로부터 수득하였다. 항-인산화ERK1/2 모노클로날 항체, 항-ERK1/2 모노클로날 항체, 항-인산화 p38 모노클로날 항체, 항-p38 모노클로날 항체, 항-인산화 JNK 모노클로날 항체, 항-JNK 모노클로날 항체, 항-인산화 IκB-α 모노클로날 항체, anti-IκB-α 모노클로날 항체 및 항-튜블린 폴리클로날 항체는 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)로부터 얻었다. 항-TLR2, 항-TLR4 및 항-히스티딘 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였다. HRP-conjugated 항-마우스 IgG 항체와 HRP-conjugated 항-래빗 항체는 Calbiochem (San Diego, CA, USA)로부터 수득하였다. IL-10, IL-12p70, CD80, CD86 및 MHC 클래스 II에 대한 피코에리트린 (PE)-공액 mAb와 F4/80에 대한 알로피코시아닌-conjugated mAb는 eBioscience (San Diego, CA, USA)로부터 구입하였다. 마우스 사이토카인 ELISA 키트는 eBioscience로 부터 얻었다.

[0036]

[0037] 1.3 Mtb CFP의 다차원 분획

[0038] Mtb H37Rv (ATCC 27294)를 소튼배지에 37° 에서 6주 동안 표면배양하고 배양액을 농축(CFP) 하였고 80% 황산암모늄에 침전시킨 후, 전술한 바와 같이 순차적으로 HIC, HAT 및 IEC에 의해 분획하였다. 타겟 단백질 밴드가 연세대 단백질 체학 연구 센터 (연세대학교, 서울, 대한민국)에서 전술된 바와 같이 LC-ESI/MS에 의해 CB 염색된 SDS-PAGE 겔 상에서 확인되었다.

[0039]

1.4 재조합 Rv2882c의 생성

재조합 Rv2882c 단백질 생성을 위해 Mtb H37Rv (ATCC 27294)부터의 게놈 DNA를 주형으로 이용하고 다음의 프라이머를 이용하여 해당 유전자(*frr*)를 PCR로 증폭하였다: 정방향, 5' -CATATGATTGATGAGGCTCTCTCGAC-3' 그리고 역방향, 5' -AAGCTTGACCTCCAGCAGCTCGCCTTC-3'. 생성된 PCR 생성물을 *Nde*I 과 *Hind*III 제한효소를 사용하여 소화시킨 후 pET-22b (+) 벡터 (Novagen, Madison, WI, USA)에 삽입하였다. 재조합 단백질을 전술한 바와 같이 제조하였다. 정제된 단백질로부터 에도톡신 오염을 제거하기 위해 재조합 단백질을 4° 에서 6시간 동안 폴리믹신 B-아가로스 (Sigma Chemical Co.)와 배양하였다. Rv2882c 제제 내 잔류 LPS의 양은 제조사의 지침에 따라 LAL 테스트 키트 (Lonza, Basel, Switzerland)를 사용하여 평가하였다. 정제된 에도톡신 없는 Rv2882c는 필터 소독되었으며 70° 에서 동결되었다. Rv2882c 단백질의 순도는 CB 염색과 항-His 항체를 사용한 웨스턴 블롯팅 분석에 의해 평가되었다.

1.5 세포독성분석

Rv2882c (10 µg/mL)를 12-웰 플레이트 (0.5 × 10⁶ cells/mL)에서 배양된 분리된 BMDM에 첨가하여 Rv2882c의 세포 독성 효과를 조사하였다. 처리 12시간 후 수확된 BMDM을 PBS를 사용하여 세척하고 FITC-아넥신 V 및 PI (BD Biosciences)으로 염색한 후 FACSCanto 유동세포분석법 (BD Biosciences)를 사용하여 분석하였다.

1.6 사이토카인 측정

전술한 바와 같이 샌드위치 ELISA를 사용하여 배양 상청액에서 IL-6, MCP-1, TNF-α, IL-12p70, IL-10, IFN-γ 및 IL-2의 정도를 판단하였다. 이러한 사이토카인 분석은 항체 제조사 (eBioscience)에서 권고된 대로 실시되었다.

1.7 유동세포분석법에 의한 세포내 사이토카인 및 표면 분자 발현분석

단일 세포 현탁액을 GolgiPlug (BD Biosciences) 존재 하에 12 시간 동안 LPS (100 ng/mL) 또는 Rv2882c (10 µg/mL)로 자극하거나 무자극인 채로 두었다. 우선 샘플을 10% (vol/vol) 정상 염소 혈청에 15분 동안 차단하고 4° 에서 유동세포분석법 완충액(PBS/2% BSA)에서 4° 에서 30분 동안 APC-공액 F4/80 항체로 염색하였다. 적당한 이소타입 정합된 면역글로불린으로 염색된 세포를 음성 대조군으로 사용하였다. 세포를 제조사의 지침에 따라 Cytofix/Cytoperm 키트 (BD Biosciences)를 사용하여 고정하고 투과시켰다. 세포 내 사이토카인을 투과성 완충 용액에서 형광-공액 항체 (eBiosciences)를 사용하여 검출하였다. 세포 표면 염색은 특이적으로 표지된 형광-공액 m항체를 사용하여 수행하였고 염색 강도는 유동세포분석법 (FACSCanto, BD Biosciences)를 사용하여 판단하였다. 그 후에 데이터를 최근에 기술된 바와 같이 FlowJo 데이터 분석 소프트웨어 (BD Biosciences)를 사용하여 분석하였다.

1.8 풀 다운 분석

BMDM (1⁷)를 용해 완충액 (50 mM 트리스 염화수소, pH 8.0; 137 mM 염화수소; 1 mM EDTA; 1% (vol/vol) 트리톤 X-100; 10% (vol/vol) 글리세롤; 1 mM PMSF; 1 µg/mL 아프로티닌, 류페틴 및 펩스타틴 각각; 1 mM Na₃VO₄; 및 1 mM NaF)으로 용해하였다. 20 마이크로그램의 His-표지된 Rv2882c 단백질 및 세포 용해물을 혼합하여 4° 에서 6시간 동안 배양한 후 제조사 지침에 따라 Ni-NTA 아가로스 비드를 첨가하였다 (Qiagen, Chatsworth, CA, USA). 비드를 용해 완충액에 희석된 세포 용해물과 혼합하고 4° 에서 2시간 동안 흔들었다. 배양 후 비드와 세포 용해물의 혼합물을 4° 에서 1 분 동안 150 g에서 원심 분리한 후, 비드를 완충액으로 3회 세척하고 원심 분리로 회수하였다. 상청액 제거 후, 비드를 SDS-PAGE 샘플 완충액에서 끓여 결합 단백질을 항-TLR2, 항-TLR4 및 항-His 항체와 면역 블롯팅에 의해 분석하였다.

1.9 면역 blotting 분석

10 $\mu\text{g/mL}$ Rv2882c로 자극 후, BMDM을 100 μL 의 용해 완충액에서 용해하였다. 면역 블롯팅을 전술한 바와 같이 수행하였다. MAPK를 포함한 대상 단백질의 에피토프를 특정한 항체를 사용하여 표지하였고, 밴드는 ECL 어드밴스 키트 (GE Healthcare, Little Chalfont, UK)를 사용하여 시각화하였다.

1.10 BMDM을 약학적 시그널링 억제제 처리

본 연구에 사용된 모든 약학적 억제제는 Calbiochem로부터 구입하였다. 디메틸 술폭시드 (Sigma)를 용매 대조군으로 최종 농도 0.1% (vol/vol)로 배양물에 첨가하였다. BMDM는 PBS를 사용하여 세척하였고 Rv2882c로 24시간 동안 처리 전에 글루타민을 함유하는 DMEM 배지에서 1시간 동안 억제제로 전처리되었다. 억제제는 조심스런 적정에 의해 결정된 다음과 같은 농도로 사용된다: U0126 (10 μM), SB203580 (20 μM), SP600125 (10 μM) 및 Bay11-7082 (5 μM). BMDM의 생존율은 MTT 분석을 사용하여 평가하였다.

1.11 BMDM 에서 체외 Mtb 성장 분석

BMDM을 Mtb로 감염 다중도 1:1 (박테리아 대 BMDM)로 4시간 동안 감염하였다. 그리고 감염된 BMDM을 아미카신 (200 $\mu\text{g/mL}$) 로 2시간 동안 처리 후 PBS로 2번 세척하였다. 감염된 BMDM을 Rv2882c (10 $\mu\text{g/mL}$) 또는 LPS (100 ng/mL)로 24시간 동안 처리한 후, CD4⁺ T 세포와 3시간 동안 공동배양하였다. 세균 부담을 판단하기 위해, 대식세포 배양물의 일부를 0.1% 사포닌을 사용하여 즉시 용해하였다. 상청액과 세포 용해물을 순차적으로 희석하고 10% OADC 농축 배지가 포함된 7H10 agar 플레이트 상에 플레이팅하여 웰 당 세균 부담을 판단하였다.

1.12 BCG 부스팅 백신 예방접종

BCG (5×10^5 CFU/0.2 mL/피하 접종) 백신 접종 후, 마우스는 전체 0.2 mL의 부피로 2주 간격으로 2회 등에 피하 투여된 디메틸 디옥타데실암모늄 브롬화물 (DDA; Sigma-Aldrich)로 유화된 10 μg 의 Rv2882c와 25 μg 의 monophosphoryl lipid A (MPL; Sigma-Aldrich)로 면역력을 갖게 되었다. 6주 후, 백신 접종된 마우스를 Mtb H37Ra (ATCC 25177)로 감염시켰다. 간단히, 자일라진:졸레틸 (9:1)의 혼합물로 마취 후, 그룹 당 12 마리의 마우스를 마우스 폐 당 H37Ra 10^6 CFU의 감염 투여량으로 현탁액 50- μL 에 기도내 감염시켰다.

1.13 통계 분석

각 실험은 적어도 3회 반복하여 수행하였으며 일관된 결과를 얻었다. 두 그룹 간 차이의 유의성은 독립 표본 학생 *t*-테스트에 의해 판단되었고, 세 그룹 이상 간 차이는 GraphPad Prism (version 4.03) 통계적 소프트웨어(GraphPad Software, San Diego, CA, USA)를 사용한 Tukey의 다중 비교 테스트에 따른 일방향 ANOVA로 평가되었다. 그래프 내의 데이터는 평균 $\pm$ SD로 나타내었다. **p* < 0.05, ***p* < 0.01 및 ****p* < 0.001은 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

<실시예 2>

Mtb 배양여과액에서 Rv2882c 단백질 확인

2.1 실험방법.

(도 1A 및 B) CFP의 황산 암모늄 침전물을 페닐세파로오스를 사용하여 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC)로 분획하였다. 주요 분획을 나누고 7분획으로 농축하였다. 각각의 주요 분획은 수산화이회석 크로마토그래피 (HAT)로 더 분획되었다. 용출액을 단백질 밴드 패턴에 따라 5 내지 9 분획으로 모으고 농축시켰다. 세 번째 분획은 DEAE 이온 교환 크로마토그래피를 이용하여 수행하였다. 단백질을 쿠마시 브릴리언트 블루로 SDS-PAGE에 의해 분석하였다. (도 1C) 재조합 Rv2882c는 BL21 세포에서 생성되었고 NTA 레진을 사용하여 정제되었다. 정제된 단백질에 마우스 항-His 항체를 사용하여 (a) SDS-PAGE 및 (b) 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. (도 1D) BMDM 상에서 Rv2882c의 세포독성 효과를 유동세포분석법으로 분석하였다. Rv2882c (10 $\mu\text{g/mL}$)를 6번째 날에 첨

가하고 배양물을 24시간 후에 수확하였다. BMDM을 항-F4/80, 아넥신 V 및PI로 염색하였다. 각 사본면에서 양성 인 세포 (아넥신 V- 및 PI-염색된 세포)의 퍼센트가 표시되었다. 결과는 세 번의 실험을 나타낸다.

[0074] **2.2. 실험결과에 대한 분석.**

[0075] 복잡한 Mtb항원으로 인한 유용한 항원 스크리닝의 한계를 극복하기 위해 Mtb CFP를 다단계 크로마토그래피로 분획하였다. 그림 1A에 도시된 바와 같이, CFP의 80% 황산 암모늄 침전물을 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC)로 일곱 분획으로 분리하고 수산화이회석 크로마토그래피 (HAT)와 이온 교환 크로마토그래피 (IEC) 로 더 분획하였다. 각 분획의 대식세포로 하여금 전염증성 사이토카인을 분비하도록 자극할 수 있는 능력을 테스트하였다. 초기 분획 3에서 수득된 100 mM HAT 분획의 IEC 분획 번호 37은 IL-12 분비를 강하게 유도하였고 SDS-PAGE 겔 상에서 단일 밴드로 나타났다 (도 1B). 이 주요 밴드는 액체 크로마토그래피 전자분무 이온화 직렬 질량 분광계 (LC-ESI/MS)에 의해 Rv2882c로 확인되었다. 제조합 Rv2882c 단백질은 대장균으로부터 정제되었고 순도는 SDS-PAGE에 의해 확인되었다. 정제된 단백질은 약 23 kDa의 분자량을 가지고 항-His 항체와 반응하였다 (도 1C). 에도톡신 함량은 생물학적 내독소 시험(LAL)법에 의해 측정되었고 극히 낮은 내독소 함량 (<0.05 EU/mL)을 가진 단백질 만이 후속 실험에 사용되었다. Rv2882c에 대한 세포독성이 대식세포 활성화와 사이토카인 분비에 영향을 미치는지를 판단하기 위하여, 24시간 동안 10 µg/mL Rv2882c로 처리된 골수 유래 대식세포 (BMDMs)의 생존율은 아넥신 V and 프로피디움 요오드화물 (PI) 염색으로 평가되었다. 그림 1D에 도시된 바와 같이, Rv2882c는 BMDMs에 유독하지 않았다.

[0077] **<실시예 3>**

[0078] **Rv2882c 가 BMDM 활성화를 유도한다는 사실확인.**

[0079] **3.1 실험방법**

[0080] (도 2A) BMDM가 100 ng/mL LPS 또는 1, 5, or 10 µg/mL Rv2882c로 24시간 동안 자극하여 생성되었다. (도 2A) 배양 상청액 내의 TNF-α, MCP-1, IL-6, IL-10 및 IL-12p70의 양을 ELISA로 측정하였다. 모든 데이터는 평균값 ±SD (n = 3)으로 나타내었다. 처리 데이터와 대조군 데이터 간 차이의 유의적 수준 (일방향 ANOVA 테스트로 결정된 *p < 0.05, **p < 0.01 or ***p < 0.001)이 표시되었고, 유의적으로 차이가 없는 처리는 n.s. 로 표시되었다. (도 2B) F4/80⁺ BMDMs에서 세포내 IL-12p70 및 IL-10 농도의 점도표. 양성 세포의 퍼센트가 각각의 패널에 나타난다. (도 2A)에 기술된 대로 BMDM을 제조하여 유동세포분석법을 사용하여 표면 마커의 발현을 분석하였다(도 2C). 세포는 F4/80⁺ BMDMs 상에서 게이팅되었다. BMDM는 항-CD80, 항-CD86 및 항-MHC class II 항체로 염색되었다. 양성 세포의 퍼센트가 각각의 패널에 나타난다. 막대 그래프는 평균값 ±SD (n = 3)으로 나타내었다. 처리 데이터와 대조군 데이터 간 차이의 유의적 수준 (일방향 ANOVA 테스트로 결정된 *p < 0.05, **p < 0.01 or ***p < 0.001)이 표시되었다.

[0081] **3. 2 실험결과에 대한 분석**

[0082] 제조합 Rv2882c가 대식세포 활성을 유도하고 대식세포 내에서 전염증성 사이토카인을 자극하였는지를 확인하기 위하여, 1, 5 또는 10 µg/mL에서 Rv2882c로 24시간 처리된 BMDM의 배양 상청액에서의 사이토카인 수준을 측정하였다. LPS를 양성 대조군으로 사용하였다. Rv2882c는 복용 의존적인 방법으로 TNF-α, IL-6, IL-12 및 MCP-1의 생성을 현저히 증가시켰으나 IL-10의 생성은 그렇지 않았다 (도 2A). 반대로, 미처리 세포나 Rv2882c-처리된 세포에 비하여, LPS는 IL-10 생성만을 현저히 유도하였다. IL-12 및 IL-10에 대한 세포내 염색 역시 BMDM에서 Rv2882c는 TNF-α, IL-6, IL-12 및MCP-1의 생성을 현저히 증가시켰으나 IL-10의 생성은 그렇지 않았고 LPS는 IL-10의 현저한 생성만을 자극하였음을 보여주었다 (도 2B). 다음으로 Rv2882c가 대식세포가 항원을 나타내는 세포 및 포식세포로서 기능하는데 중요한 대식세포 표면 분자의 발현을 조절하는지 조사하였다. 유동세포분석법에 따르면 미처리 세포에서의 발현 수준과 비교하였을 때 Rv2882c 가 복용의존적인 방법으로 CD80, CD86 및 MHC 클래스 II 분자의 발현을 현저히 증가시키는 것으로 나타났다 (도 2C). 이러한 효과는 양성 대조군으로 사용된 LPS의 효과와 비교할만한 것이었다. LPS가 정제된 제조합 단백질에서 제거되었으나, Rv2882c-유도 대식세포 활성화가 LPS 오염에 기여할 수 있는지를 테스트하였다. Rv2882c 단백질의 프로테아제 K 분해 및 가열 변성 모두 TNF-α, IL-6 및 MCP-1 생성을 막았다 (도 7). 더욱이, 폴리믹신 B와 BMDM의 전배양은 Rv2882c-유도 사이토카인 생성을 억제하지 않았고 LPS의 자극 효과를 감소시켰다 (도 7). 이는 Rv2882c의 생물학적 활성이 LPS 오염의 결과가 아님을 보여준다. 이러한 결과는 Rv2882c가 대식세포 활성화를 효과적으로 유도하고 항원

제시세포로서의 기능적인 역할을 촉진함을 제시한다.

[0084] <실시예 4>

[0085] Rv2882c는 TLR4 경로를 통하여 대식세포 활성화를 유도한다.

[0086] 4.1 실험방법

[0087] (도 3의 A, B) 막대 그래프는 WT, TLR2^{-/-} 및 TLR4^{-/-} 유래 Rv2882c-처리 F4/80⁺-게이팅 BMDM 상 CD80 또는 CD86 수준을 보여준다. WT, TLR2^{-/-} 및 TLR4^{-/-} 마우스 유래 BMDM를 Rv2882c (10 µg/mL)로 24시간 동안 처리하였다. 양성 세포의 퍼센트가 각각의 패널에 나타난다. 막대 그래프는 세 번의 독립적인 실험에서 F4/80⁺ 세포 상의 표면 분자의 평균값 ±SEM을 보여준다. 상청액을 ELISA로 측정하였다. 모든 데이터는 평균값 ±SD (n = 3)으로 나타내었다. ***p < 0.001= Rv2882c-처리 WT BMDM 값과 비교하여, 처리 값의 유의성. (도 3의 C, D) 막대 그래프는 WT, MyD88^{-/-} 및 TRIF^{-/-} 마우스 유래 Rv2882c-처리 F4/80⁺-게이팅 BMDM 상의 CD80 또는 CD86 발현 수준을 보여준다. MyD88^{-/-} 및 TRIF^{-/-} 마우스 유래 BMDM를 Rv2882c (10 µg/mL)로 24시간 동안 처리하였다. 양성 세포의 퍼센트가 각각의 패널에 나타난다. 막대 그래프는 세 번의 독립적인 실험에서 F4/80⁺ 세포 상의 표면 분자의 평균값 ±SEM을 보여준다. 상청액을 ELISA로 측정하였다. 모든 데이터는 평균값 ±SD (n = 3)으로 나타내었다. ***p < 0.001= Rv2882c-처리 WT BMDM 값과 비교하여, 처리 값의 유의성. (도 3의 E) WT, TLR2^{-/-} 및 TLR4^{-/-} 마우스 유래 BMDM를 Rv2882c (10 µg/mL)로 1시간 동안 처리하였고 FITC-공액 항-His 모노클로날 항체 (mAb)로 염색하였다. T 양성 세포의 퍼센트가 각각의 패널에 나타난다. 막대 그래프는 평균값 ±SD (n = 3)으로 나타내었다. ***p < 0.001= Rv2882c-처리 WT BMDM 값과 비교하여, Rv2882c-처리 TLR4^{-/-} BMDM 값의 유의성. (도 3의 F) 항-His 항체로 면역침강(IP)과 항-TLR2 또는 -TLR4 항체로 면역 블롯팅 (IB). BMDM을 Rv2882c (10 µg/mL)로 6시간 동안 처리하였다. 세포를 수확하여 세포 용해물을 항-마우스 IgG, 항-His, 항-TLR2, 또는 항-TLR4로 면역침강하는데 사용하였다. 그 후, 단백질을 항-TLR2 또는 항-TLR4 항체로 면역 블롯팅으로 시각화하였다. 보여지는 총합은 평균 세포 용해물(투입)을 나타낸다.

[0089] 4.2 실험결과에 대한 분석.

[0090] 몇몇의 미코박테리아 단백질은 TLR2- 및/또는 TLR4-의존적 신호 전달 경로를 통해 대식세포를 활성화하는 것으로 알려져 있다. Rv2882c-유도 대식세포 활성화가 TLR-의존적인지 확인하기 위하여 C57BL/6J 야생형 (WT), TLR2^{-/-} 및 TLR4^{-/-} 마우스로부터 BMDM을 제조하고 Rv2882c로 24시간 동안 처리하였다. CD80 및 CD86과 같은 표면 분자의 발현과 전염증성 사이토카인의 생성은 TLR4^{-/-} 마우스에서는 Rv2882c-처리 BMDM가 크게 감소하였으나 WT or TLR2^{-/-} 마우스에서는 그렇지 않았다 (도 3A 및 B). TLR은 MyD88 및 TRIF와 같은 Toll/IL-1 receptor (TIR) domain-containing adaptor를 통해 신호전달 캐스케이드를 개시함으로써 선천성 면역 반응을 촉진하는데 중요하다. MyD88는 모든 TLR에 공통적이거나 TRIF는 MyD88-비의존적 신호전달 경로의 TLR4-매개 활성화에 필수적이다. 예상된 대로, WT 마우스와 비교하여, 표면 분자의 Rv2882c-유도 발현과 전염증성 사이토카인의 생성은 MyD88^{-/-} and TRIF^{-/-} 마우스에서 BMDM가 크게 감소하였다. TLR4^{-/-} 마우스에서는 Rv2882c-처리 BMDM가 크게 감소하였으나 WT or TLR2^{-/-} 마우스에서는 그렇지 않았다 (도 3C 및 D). 다음으로, Alexa488-공액 항-His 다중클론성 항체를 사용하여 Rv2882c가 TLR4를 통하여 대식세포 표면에 결합할 수 있는지 시험하였다. 유동세포분석법은 Rv2882c가 TLR4^{-/-} 대식세포 표면이 아닌 WT 및 TLR2^{-/-} 대식세포 표면에 결합함을 나타냈다 (도 3E). 우리는 항-TLR2 또는 항-TLR4 항체 및 항-His 항체로 면역침전 반응을 수행하여 Rv2882c 와 TLR4의 상호작용을 확인하였다 (도 3F). 이러한 발견으로 Rv2882c가 TLR4를 통해 대식세포 활성화를 유도하여 세포 표면 분자의 발현과 전염증성 사이토카인의 생성을 증가시킴을 알 수 있다.

[0092] <실시예 5>

[0093] Rv2882c가 미토겐-활성화 단백질 키나제 (MAPK)와 NF- κ B 경로를 통해 대식세포 활성을 유도한다.

[0094] 5.1 실험방법

[0095] (도 4A) Rv2882c 10 μ g/mL Rv2882c 로 처리된 BMDM에서 시간에 따른 단백질 발현. 세포 용해물에 phospho-p38 (p-p38), p38, phospho-ERK1/2 (p-ERK1/2), ERK1/2, phospho-I κ B- α (p-I κ B- α), I κ B- α , phospho-JNK (p-JNK) 및 JNK에 특이한 항체를 사용하여 SDS-PAGE 와 면역 블롯팅을 수행하였다. -튜블린을 시토졸 분획의 부하 대조군으로 사용하였다. (도 4B) BMDM을 10 μ g/mL Rv2882c로 24시간 동안 처리하기 전에 p38 (SB203580, 20 μ M), ERK1/2 (U0126, 10 μ M) 및 NF- κ B (Bay11-7082, 5 μ M)의 약학적 억제제나 DMSO (운반제 대조군)으로 1시간 동안 처리하였다. (도 4C) 배양 배지에서 TNF- α , IL-6 및 MCP-1의 양을 ELISA로 측정하였다. 보여지는 데이터는 평균값 $\pm$ SD (n = 3)으로 나타내었다. 세 개의 독립적인 실험 중 하나의 대표적인 플롯이 도시된다. *** p < 0.001 = 독립 표본 학생 t -테스트로 측정된 대로, Rv2882c-처리 BMDM 값과 Rv2882c 와 약학적 억제제로 처리된 BMDM 값 간의 유의한 차이를 보여준다.

[0097] 5.2 실험결과에 대한 분석

[0098] MAPK 와 NF- κ B는 대식세포 내에서 전염증성 사이토카인의 생성을 포함한 면역 반응을 유도하는 데 중요한 요소이다. 따라서, Rv2882c에 대응한 MAPK 와 NF- κ B의 활성화를 조사하였다. BMDM에서 ERK1/2, p38, JNK 및 NF- κ B의 인산화 프로파일을 분석하기 위한 면역 블롯팅은 대식세포에서 p38, ERK1/2 및 JNK를 포함하여 MAPK의 인산화를 촉발하였음을 보여준다 (도 4A). 또한, Rv2882c는 I κ B- α 의 인산화와 분해를 유도하였고 p65의 시토솔로부터 핵으로의 유의한 전위를 유도하였다. 폴리믹신 B 처리는 MAPK 와 NF- κ B의 Rv2882c-유도 인산화에 영향을 미치지 않았으나 LPS-유도 인산화를 저해하지 않았다. 다음으로, 대식세포의 Rv2882c-유도 활성화를 위한 MAPK 와 NF- κ B 활성의 중요성을 매우 특이한 키나제 억제제를 사용하여 조사하였다. Rv2882c-유도 전염증성 사이토카인 생성은 테스트된 약학적 억제제에 의해 크게 감소하였고 대식세포의 표면에 동시 자극 분자의 발현이 이러한 억제제에 의해 현저히 차단되었다 (도 4B 및 C). 이러한 결과는 MAPK 와 NF- κ B 신호전달 경로가 Rv2882c-유도 대식세포 활성화에 필수적이라는 것을 제시한다.

[0100] <실시예 6>

[0101] Rv2882c가 효과/기억 T세포군의 확장을 유도한다.

[0102] 6.1 실험방법

[0103] 세포는 재료 및 방법에 기재된 바와 같이 제조한다. (도 5A) 세포 내 사이토카인 및 전사 인자를 평가하기 위하여 전락을 게이팅한다. 모든 샘플은 표면 분자를 위해 염색되고 포워드 산란 (FSC) 및 측면 산란 (SSC)에 기초하여 게이팅된다. T세포는 CD4⁺ T 세포의 표면 발현 패턴에 기초하여 FSC 대 SSC에 의해 림프구 게이트로부터 게이팅된다. CD4⁺ T 세포를 사용하여, CD62L 및 CD44에 대한 특정 세포 염색은 자극된 비장 세포 또는 폐에 나타난다. BMDM은 24시간 동안 Rv2882c (10 μ g/mL) 또는 LPS (100 ng/mL)로 처리하였다. 다음으로, Mtb-감염된 마우스의 폐 (도 5B, D) 또는 비장 (도 5C, E)에서 얻은 배지 또는 CD4⁺ T 세포를 각각의 웰에 첨가하고 3일간 배양하였다. (도 5B and C) 처녀 CD4⁺ T 세포 (CD4⁺CD44⁻CD62L⁺) 및 효과/기억 CD4⁺ T 세포 (CD4⁺CD44⁺CD62L⁻)의 수를 유동 세포 계측법으로 측정하였다. (도 5D 및 E) IFN- γ 및 IL-2의 수준을 ELISA에 의해 결정하였다. 제시된 데이터는 일방향 ANOVA에 의해 측정된 $\pm$ SD (n = 15) 평균값; * p < 0.05, ** p < 0.01 또는 *** p < 0.001 = Rv2882c-처리 및 미처리 또는 Rv2882c-처리 및 Ag85B-처리 세포 간의 상당한 차이를 나타낸다. 유의한 효과가 없는 처리는 n.s.로 표시한다.

[0105] 6.2. 실험결과에 대한 분석.

[0106] Rv2882c에 의해 활성화된 대식세포가 Mtb-감염 마우스에서 효과/기억 T 세포군을 특별히 유도하는지 평가하기 위하여, 유동세포분석법을 이용하여 CD4⁺ T 세포 상에서 CD62L 및 CD44의 표면 발현 수준을 분석하였다. 처녀 T 세포는 CD62L^{high}CD44^{low} 표현형을 나타낸다고 알려져 있으며, 효과/기억 T세포는 CD62L^{low}CD44^{high} 표현형을 나타낸

다고 알려져 있다. Mtb H37Ra-감염 WT 마우스 유래 비장 또는 폐 세포 현탁액에서 MACS를 통해 분리되었고 감염 후 4주에 미감염 마우스 유래 Rv2882c-처리 BMDM과 3일 동안 공동배양 되었다. 그림 5A에 도시된 바와 같이, CD4 표지 세포를 게이팅하여 FACS 분석으로 T 세포 표면 상의 분자를 평가하였다. 항원 85B (Ag85B)는 강력한 백신 성분으로서 제어 항원으로 사용되었다. LPS- 또는 Ag85B-처리 대식세포와 비교하여, 마우스의 폐와 비장으로부터 Rv2882c-처리 대식세포가 효과/기억 ($CD62L^{low}/CD44^{high}$) T 세포군의 현저한 확산을 유도하였고, 비장과 폐에서 처녀 ($CD62L^{high}/CD44^{low}$) T 세포군은 Rv2882c-처리 대식세포와 공동 배양물에서 현저하게 감소하였다 (도 5B 및 C). 또한, IFN- γ 및 IL-2 수준에 ELISA를 수행하여 Th1 세포의 효과 및 기억 세포로의 분화와 관련된 사이토카인의 생성을 평가하였다. 효과/기억 T 세포의 반응 패턴과 유사하게, Rv2882c-처리 대식세포와 공동 배양한 폐 및 비장의 T 세포는 LPS- 또는 Ag85-처리 대식세포와 비교하여 현저하게 높은 IFN- γ 및 IL-2 수준을 생성하였다 (도 5D 및 E). 이러한 데이터는 Rv2882c가 효과/기억 T 세포의 확산 및 발달을 유도할 수 있다는 것을 보여준다.

[0108] <실시예 7>

[0109] Rv2882c로 BCG를 부스팅하는 것은 백신의 예방 효과를 향상시킨다.

[0110] 7.1 실험방법.

[0111] 감염 절차는 재료 및 방법에 기재된 바와 같이 제조한다. 챌린지 후 4주가 경과한 뒤, 동물의 비장과 폐를 수확하고 기관 당 세균 수 (CFU)를 세었다. (도 6A) BCG예방 접종에 대한 일정, Rv2882c 부스팅 및 Mtb 챌린지. (도 6B) 각 그룹의 폐와 비장 내 세균 하중을 감염 전용 그룹과 대비하여 평균 ($\pm$ SEM) $\log_{10}$ CFU/기관 ($n = 5$); $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$ 로 나타낸다. (도 6C) 비장 및 폐 세포를 각 그룹의 마우스로부터 수확하고, 사이토카인 수준을 ELISA로 분석하였다. 예방 접종된 각 그룹의 폐 및 비장 세포를 3일 동안 Ag85B (10 μ g/mL) 또는 Rv2882c (10 μ g/mL)로 자극하였다.

[0113] 7.2 실험결과에 대한 분석.

[0114] Rv2882c가 백신으로 사용될 수 있는 잠재력을 가지고 있는지 여부를 확인하기 위하여, 우리는 BCG 단독 예방 접종에 비해 Rv2882c와 BCG 부스트에 후속하는 Mtb H37Ra-챌린지에 대한 예방 수준을 조사하였다. Mtb H37Rv 및 H37Ra 균주는 같은 부모 균주에서 유래하지만 실험 동물에서의 독성에 차이가 있다. 감염의 위험이 없기 때문에 실험에 무병원성 H37Ra 균주를 사용하는 것이 용이하다. 마우스 모델 및 H37Ra 균주를 사용하여 백신 효과를 테스트할 수 있는지 여부를 확인하기 위하여, 우리는 우선 마우스에서 이 균주의 지속성을 조사하였다. 마우스의 폐에서 Mtb H37Ra 성장은 기관 내 감염 후 3주 시점에서 정점에 도달하였으며, 그들의 숫자는 26주까지 마우스의 폐와 비장에 (1 로그 이내로) 유지되었다. 이는 Mtb H37Ra가 생존가능하며 백신 후보 스크리닝에 사용될 수 있음을 나타낸다. 그림 6A에 도시된 바와 같이, 모든 마우스는 접종되고 기관 내에서 Mtb H37Ra로 챌린지되었다. 폐와 비장의 미코박테리아 부담은 후-챌린지 4주 시점에서 측정하였다. Ag85B는 대조 항원으로 포함된다. BCG 백신은 비-백신 접종 군에 비해 폐 (1.76 $\log_{10}$)와 비장 (-1.19 $\log_{10}$)의 세균 하중을 크게 감소시켰다 (그림 6B). 항원-부스트 그룹의 세균 하중도 비접종 그룹에 비해 크게 감소하였다. Ab85B-부스트 마우스는 BCG-접종 마우스에 비해 약간 낮은 세균 수를 갖지만, 이 차이는 유의하지 않다. 흥미롭게도, Rv2882c-부스트 마우스는 BCG-접종 마우스보다 훨씬 낮은 세균 수를 갖는다 ($P < 0.05$). Rv2882c-부스트 마우스가 Ag85B-부스트 마우스보다 약간 낮은 세균 수를 갖더라도 이들 그룹 사이의 수는 유의한 차이를 갖지 않는다. Th1-매개 면역 반응은 Mtb에 대한 예방 면역에 있어서 중요한 역할을 한다. Mtb 챌린지 후 4주가 되는 시점에서, 비장 세포 또는 폐 세포는 시험관 내에서 Ag85B 또는 Rv2882c로 자극되고, 생성된 사이토카인은 ELISA에 의해 결정되었다. 특히, 자극 항원은 해당 항원-부스트 마우스에서 얻은 세포에서 사이토카인 생성을 유도하였다 (그림 6C). 폐 세포에서의 Ag85B-유도 IFN- γ 생산과 비장 세포에서의 IL-2 생산은 BCG 단독 또는 Rv2882c-부스트 마우스보다 크게 높았다. BCG 단독 또는 Rv2882c-부스트 마우스에 비해 Rv2882c는 Rv2882c-부스트 마우스에서 얻은 폐 세포 및 비장 세포에서 유의하게 더 높은 IL-2 및 IFN- γ 생산을 유도하였다. 이러한 결과는 Rv2882c와 함께 BCG를 부스팅하는 것이 우리 모델에서 단기 예방 효과 및 Th1 사이토카인 반응을 이끌어냄을 시사한다.

<실시예 8>

전체적인 실험에 대한 결과 고찰

대식세포는 병원체의 인식과 대응에 중요한 역할을 하는 TLR과 식세포 수용체를 발현시키며, 타고난 면역 반응의 개시에 필수적이다. 많은 미코박테리아 성분은 대식세포의 강력한 활성체이며 타고난 면역 반응을 자극하는 리간드로서 작용한다. 미코박테리아 또는 그 구성요소에 의한 TLR 결찰은 병원균에 대한 적응 면역 반응을 유도하는데 매우 중요한 전염증성 사이토카인과 케모카인의 생산을 끌어내는 대식세포 및 수지상 세포 내에서의 시그널 캐스케이드를 개시한다. 본 연구에서, 우리는 새로 확인된 Mtb 단백질인 Rv2882c가 대식세포로 하여금 전염증성 사이토카인을 생산하고 동시 자극 및 MHC 분자를 TLR4 경로를 통해 발현시키도록 강하게 활성화시킴을 보여줌을 확인하였다.

이전에, 우리는 다단계 크로마토그래피로 Mtb CFP를 분별하고 자신의 면역 반응성을 결정하는 것이 복잡한 Mtb 항원 시스템에서 단백질을 식별하는데 있어서 강력한 접근임을 발견하였다. 본 연구에서, 우리는 Mtb CFP의 다차원 분류를 통하여 신규한 대식세포-활성화 단백질인 Rv2882c를 확인하였다. Rv2882c는 막 분획 및 Mtb H37Rv의 배양여액에서 발견되는 리보솜 재활용 인자이다. 그러나, 미코박테리아 감염 동안 Rv2882c의 기능적 역할에 대해서는 거의 알려진 바가 없으며, 그 면역학적 특성도 입증되지 않았다.

우리는 전염증성 사이토카인 TNF-, IL-6 및 MCP-1 수준이 Rv2882c 단백질로 자극된 BMDM에서 증가된 것으로 나타났다. 중요한 전염증성 사이토카인인 TNF-은 미코박테리아 감염에 대한 숙주 예방 면역 반응에 중요한 역할을 한다. 추가로, MCP-1은 실질적으로 숙주 항-미코박테리아성 염증 반응에 기여한다. Rv2882c는 또한 미코박테리아에 대한 숙주 방어의 핵심 선수인 IL-12p70 분비를 증가시키는 반면, 면역-조절 사이토카인인 IL-10 분비를 유도하지는 않는다. IL-12는 Mtb 감염 제어에 필수적인 IFN- γ -생산 T 세포의 생성을 구동하는 핵심 요소이다. IFN- γ /IL-12 면역 축의 예방 역할은 잘 성립되었다. 이를 종합하면, 우리 데이터는 Rv2882c 단백질이 대식세포를 활성화하고 Th1 유형 면역 반응을 구동함을 시사한다.

대식세포는 식균 작용, T세포에 대한 항원 제시 및 효과 T세포 반응 향상에 의한 주된 면역 조절기이다. 고도의 다형성 MHC 클래스 I 및 II 분자와 동시 자극 분자는 이러한 반응에 관여한다. 본 연구에서, Rv2882c는 대식세포를 자극하고, 그로 인해 CD80, CD86 및 MHC 클래스 II 분자의 발현을 증가시킨다. 이들 데이터는 Rv2882c가 미코박테리아에 대한 방어 면역을 위해 T세포를 활성화하는 대식세포의 능력을 개선함을 시사한다. 본 연구에서, Rv2882c-활성화 대식세포는 동일한 소스에서 얻은 Ag85B-활성화 대식세포의 효과에 비해 효과/기억 T 세포 인구의 유의한 증대 및 Mtb-감염 마우스에서 얻은 비장 또는 폐 세포와의 공동배양에서의 IFN- γ 및 IL-2의 생산을 유도한다. 예상한 바와 같이, LPS-활성화 대식세포는 효과/기억 T 세포 반응을 유도하지 않았다.

본 연구에서, 면역 침강 분석 및 TLR4 또는 TLR2 녹아웃 마우스를 사용하는 실험에 의해, 우리는 TLR4, MyD88 및 TRIF가 대식세포의 Rv2882c 활성화를 매개하고, Rv2882c가 NF- κ B 및 MAPK 신호 전달 경로를 통해 동시 자극 분자 및 전염증성 사이토카인 발현을 증가시킴을 알 수 있다. 몇몇의 미코박테리아 성분은 TLR2- 또는 TLR4-매개 경로를 통하여 대식세포 또는 수지상 세포의 활성화를 유도하는 것으로 보고되었다 대부분의 PE/PPE 단백질 및 19-kDa 리포단백질의 경우 TLR2, 그리고 열처리 단백질 65, RpfE 및 Rv0652의 경우 TLR4. TLR은 Th1 또는 Th2 면역 반응을 구동하는 수지상 세포의 활성화뿐만 아니라 항염증성 사이토카인 IL-10 또는 전염증성 사이토카인을 분비하는 대식세포의 활성화를 포함하는 다양한 반응을 이끌어낸다. 이는 개별 항원이 대식세포 및 수지상 세포에 다른 영향을 미칠 수 있음을 나타낸다. 다른 연구는 미코박테리아 또는 그 구성요소가 MAPK 및 NF- κ B를 포함하는 세포 내 신호 전달 경로를 유발함을 보여준다. Rv2882c와 LPS, 그리고 주로 TLR4에 의한 Rv2882c의 시그널링에 의해 유도되는 반응의 유사성은 단백질 제조에 있어서 LPS 오염의 가능성을 시사한다. 그러나, 여러 줄의 증거가 TLR4를 통한 시그널링과 대식세포의 활성화는 LPS오염 보다는 Rv2882c에 기인함을 나타낸다. MyD88은 Mtb에 대한 타고난 면역 반응을 개시하는데 중요한 역할을 한다. MyD88 이외에, TLR4는 어댑터 분자 TRIF에 의해 매개되는 제2의 경로를 통해 세포 내 시그널링을 유도할 수 있다. 여기서, 우리는 또한 Rv2882c가 MyD88 및 TRIF를 통해 TNF- α 및 MCP-1 생산을 유도함을 알 수 있다.

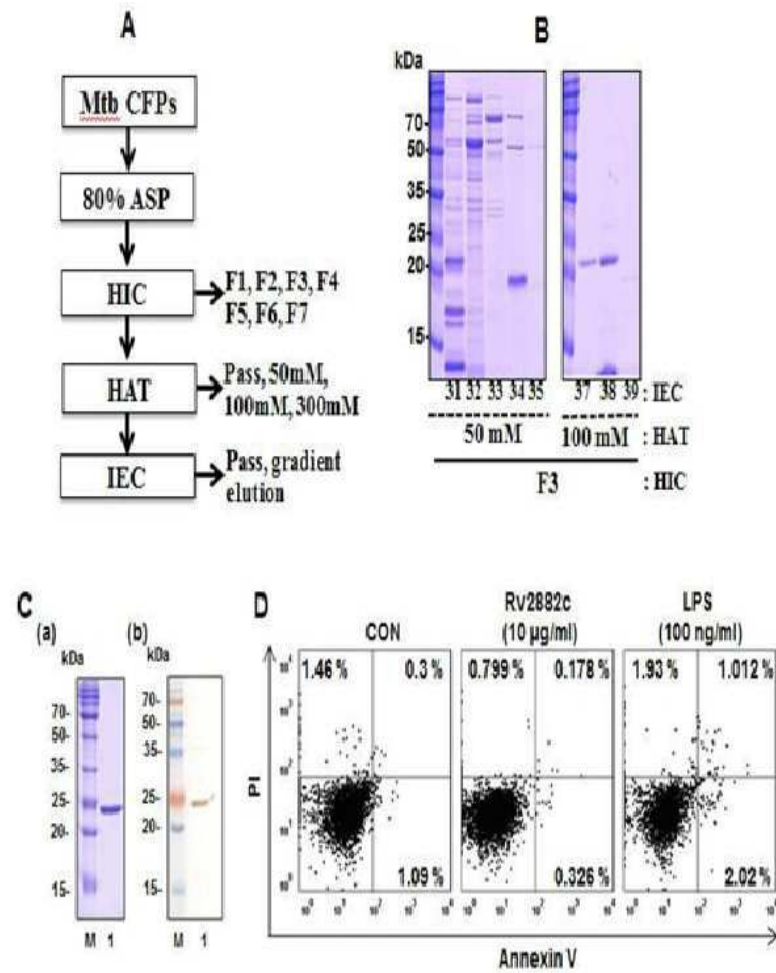
최근, 19-kDa 리포단백질이 인간 대식세포에서 자식 작용 유도를 통해 항-미코박테리아 활성을 발휘하는 것으로 밝혀졌다. 그러나, 이 리포단백질은 장기간 단백질에 노출된 뒤, 대식세포에서 MHC-II 발현과 IFN- γ -규제 MHC-II 항원 처리를 억제한다; 이는 또한 CD4+ T 세포 활성화도 억제한다. PPE18는 이후 IL-10을 분비하는 대식세포를 활성화하고, Rv1917c는 Th2 면역 반응을 구동하기 위하여 수지상 세포의 성숙을 유도한다. 따라서, 이들 단백질은 TB 백신에 포함되기에 적합하지 않을 수 있다. 대조적으로, PPE57 또는 PPE26 단백질을 과발현하는 재조합 BCG는 대식세포의 TLR-의존성 활성화를 유도하고 Th1 면역 반응을 구동하여 마우스의 Mtb에 대한 백신의 예

방 효과를 개선시키는 것으로 보고되고 있다. 본 연구에서, Rv2882c는 대식세포 활성화를 유도하여 전염증성 사이토카인 분비, 효과/기억 T세포 인구 증가 및 Th1 면역 반응 유도를 이끌어냈으며, 이는 이 단백질이 유용한 백신 항원이 될 수 있음을 시사한다. 따라서, 우리는 무병원성 Mtb H37Ra를 사용하여 설립 모델에서 BCG 부스터로서의 Rv2882c의 예방 효과를 테스트하였다. 사실, BCG 백신 단독 또는 Ag85-부스팅과 함께하는 경우 우리 테스트 시스템에서 상당한 효능이 있는 것으로 드러났다. 이는 이것이 단백질이 백신 잠재성을 가지고 있는지 여부를 테스트하는데 사용될 수 있음을 나타낸다. 우리는 Rv2882c로 BCG를 부스팅하는 것이 BCG 단독 사용 또는 Ag85B-부스트 뒤 BCG-프라이밍 사용에 비해 백신의 예방 효과가 개선되었음을 보여준다. 그러나, 본 연구의 한계는 우리가 Rv2882c의 단기 예방 효과만 결정하고 백신 효과가 무병원성 Mtb 균주에 대해서만 평가되었다는 것이다. 따라서, 이 단백질의 백신 효과 및 Mtb H37Rv에 대한 Rv2882c의 예방 메커니즘에 대한 추가 연구가 진행되고 있다. 종합적으로, 본 연구에 제시된 데이터는 신규한 면역 자극성 항원 Rv2882c가 효과적인 TB 백신의 합리적인 설계를 위한 후보가 되어야 함을 시사한다.

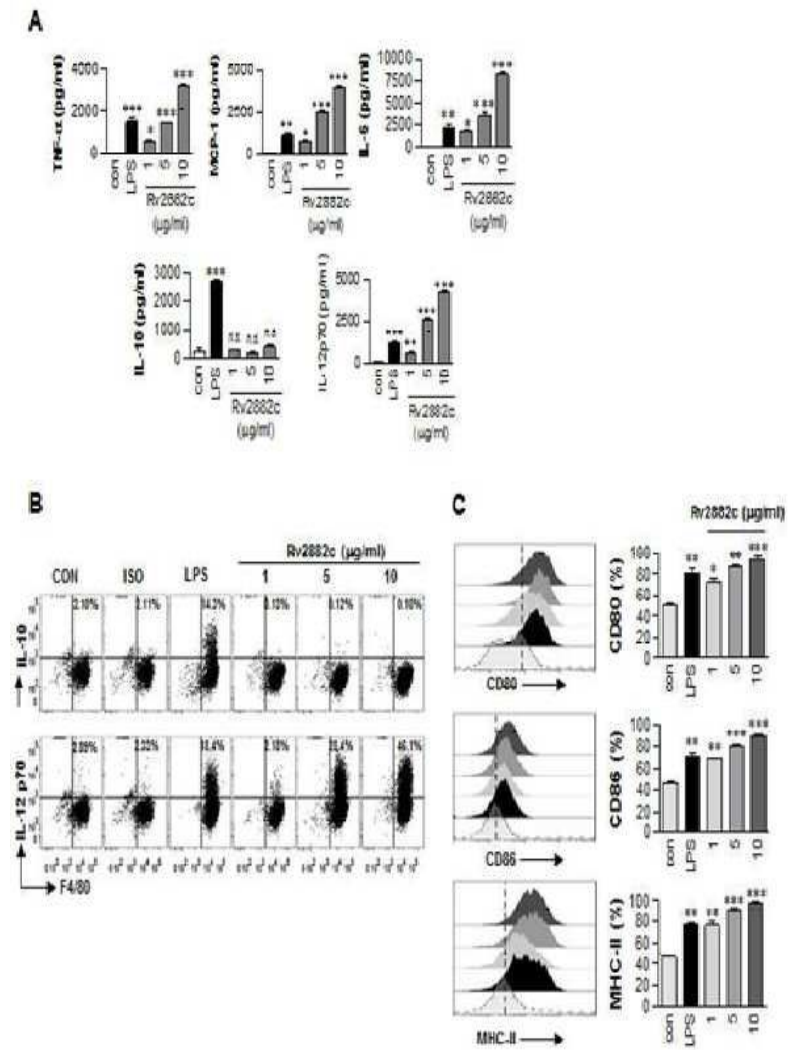
- [0125] <실시예 9>
- [0126] Rv2882c 아미노산 서열
- [0127] MIDEALFDAEEKMEKAVAVARDDLSTIRTGRANPGMFSRITIDYYGAATPITQLASINVP
- [0128] EARLVVIKPYEANQLRAIETAI RNSDLGVNPTNDGALIRVAVPQLTEERRREL VKQAKHK
- [0129] GEEAKVSVRNIRRKAMEELHRIRKEGEAGEDEVGRAEKDLDKTTHQYVTQIDELVKHKEG
- [0130] ELLEV

도면

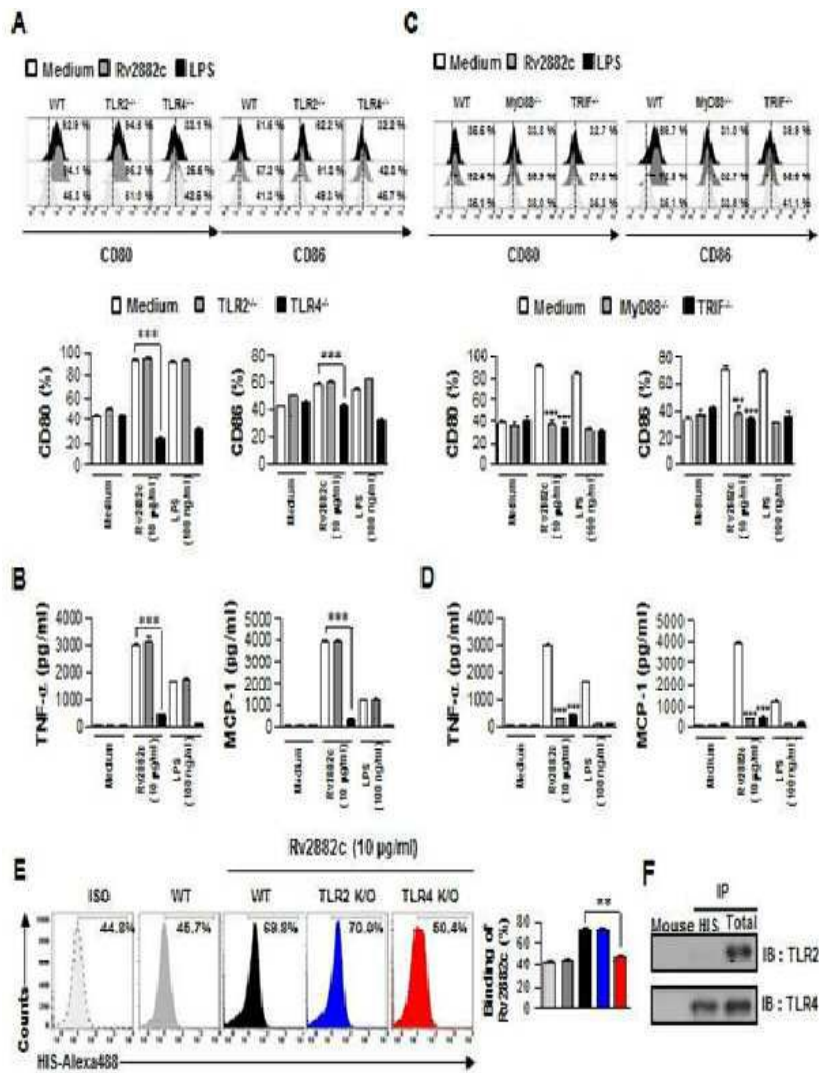
도면1



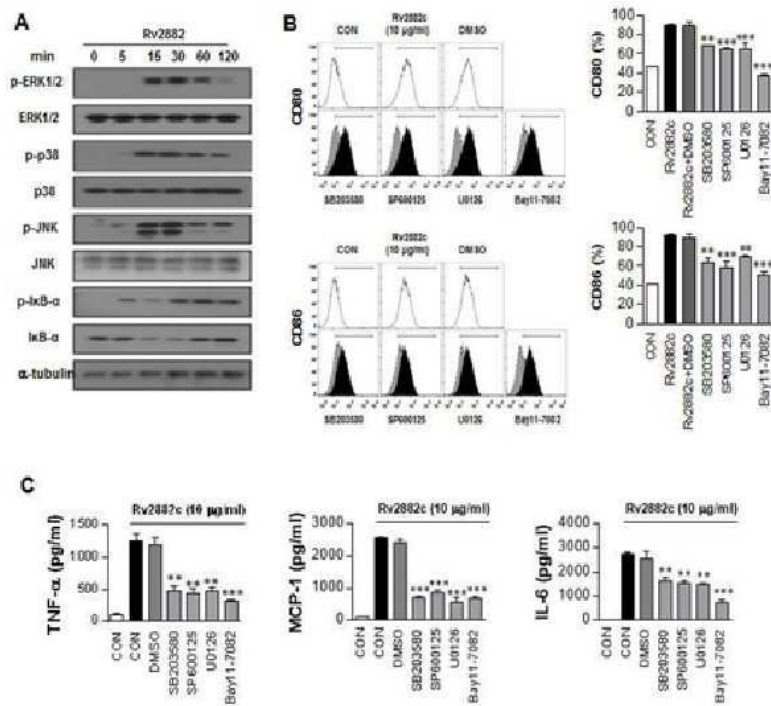
도면2



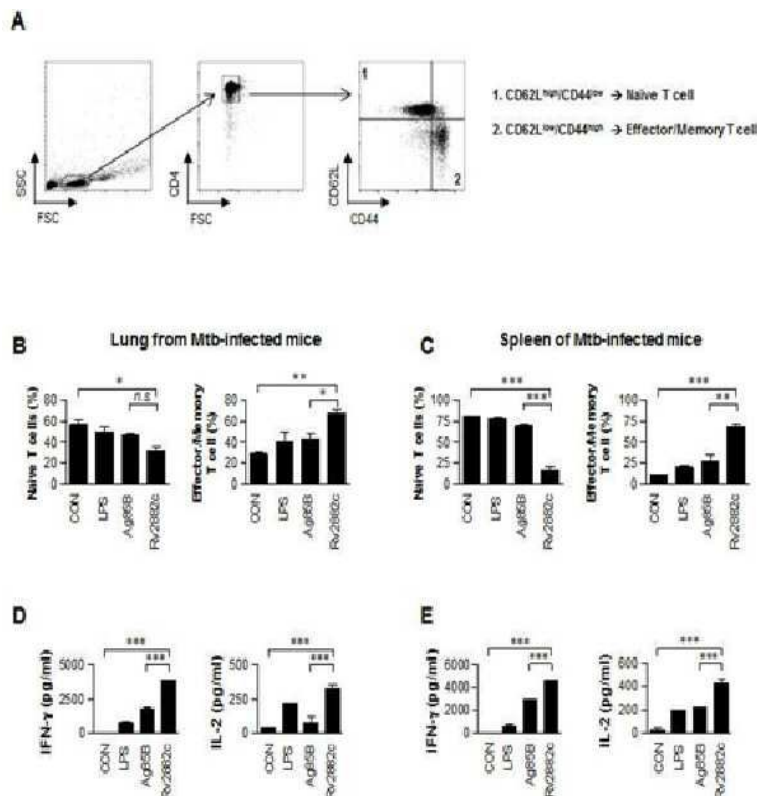
도면3



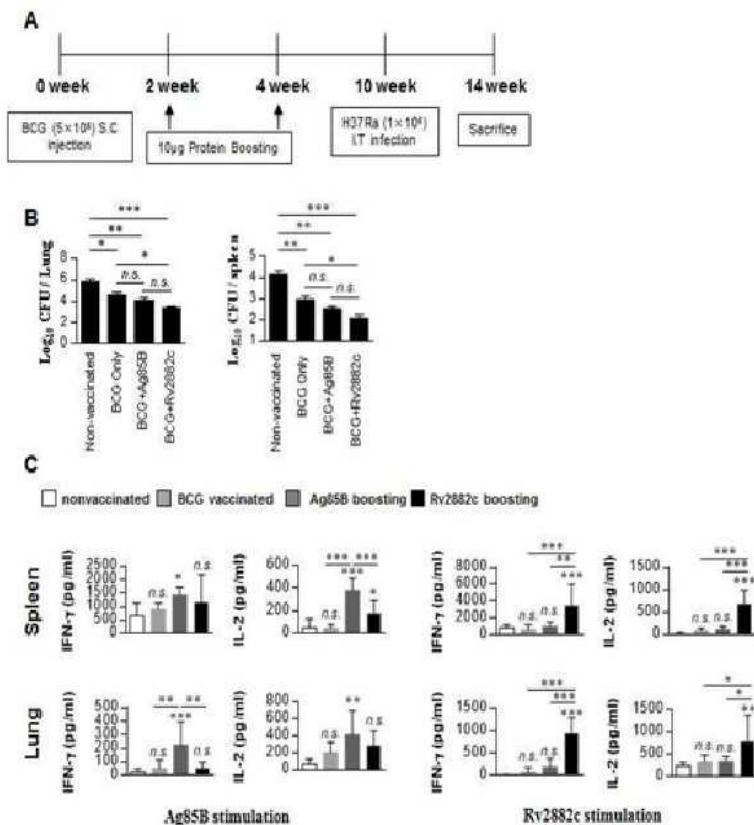
도면4



도면5



도면6



서열 목록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
 Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University

<120> Active compositions of macrophage containing the Rv2882c protein

<130> P16289

<160> 1

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 185

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Rv2882c

<400> 1

Met Ile Asp Glu Ala Leu Phe Asp Ala Glu Glu Lys Met Glu Lys Ala

1 5 10 15

Val Ala Val Ala Arg Asp Asp Leu Ser Thr Ile Arg Thr Gly Arg Ala

20 25 30

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

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

 Asp Lys Thr Thr His Gln Tyr Val Thr Gln Ile Asp Glu Leu Val Lys
 165 170 175
 His Lys Glu Gly Glu Leu Leu Glu Val
 180 185