



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0113956
(43) 공개일자 2008년12월31일

(51) Int. Cl.

C12N 5/06 (2006.01) C12N 5/08 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0063030

(22) 출원일자 2007년06월26일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자

박세호

서울 마포구 대흥동 동양엔파트 103동 1501호

신정훈

서울 성북구 안암동2가 113-2 자은빌라 B동 301호

(74) 대리인

김석현, 이희숙

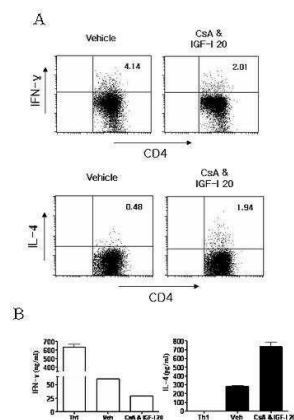
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 제1형 CD4+ T-세포를 제2형 CD4+ T-세포로변환시키는 방법 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 제1형 CD4+ T-세포를 제2형 CD4+ T-세포로 변환시키는 방법 및 이의 용도에 관한 것으로서 보다 상세하게는 제1형 CD4+ T 세포에 사이클로스포린 A(cyclosporin A), 마우스 인슐린 성장 유사인자 I(mouse insulin growth like factor-I), 항원, IL-4(interleukin-4), IL-2, 항-IFN γ 항체 및 항-IL-12 항체로 처리하여 제1형 CD4+ T-세포를 제2형 CD4+ T-세포로 변환시키는 방법 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 방법은 제1형 CD4+ T 세포를 제2형 세포로 형질변환시키는 효과를 가진다. 따라서 본 발명의 방법 및 이를 이용하여 제조된 제2형 CD4+ T 세포는 동일한 항원에 작용하는 제1형 CD4+ T 세포의 작용을 억제하여 자가면역질환의 예방 및 치료의 목적으로도 사용할 수 있다.

대표도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 F104AC010001-06A0301-00130

부처명 과학기술부

연구사업명 과학기술부 특정연구개발사업, 차세대성장동력사업(바이오신약장기)

연구과제명 면역기능제어기술 개발

주관기관 이화여자대학교

연구기간 2006년 07월 31일 ~ 2008년 07월 30

특허청구의 범위

청구항 1

- (a) 제1형 CD4+ T 세포를 사이클로스포린 A(cyclosporin A)를 포함하는 배지에서 배양하는 단계;
- (b) 상기 (a) 단계에서 배양된 세포를 마우스 인슐린 성장 유사인자 I(mouse insulin growth like factor-I)을 포함하는 배지에서 배양하는 단계; 및
- (c) 상기 (b) 단계에서 배양된 세포를 항원, IL-4(interleukin-4), IL-2, 항-IFN γ 항체 및 항-IL-12 항체를 포함하는 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 제2형 CD4+ T 세포의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 배양은 사이클로스포린 A를 2 내지 3 μ M의 농도로 첨가된 배지에서 10분 내지 20분간 배양하는 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 (b) 단계의 배양은 마우스 인슐린 성장 유사인자 I을 10 내지 30 ng/ml의 농도로 첨가된 배지에서 20분 내지 40분간 배양하는 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 (c) 단계의 배양은 항원, IL-4(interleukin-4), IL-2, 항-IFN γ 항체 및 항-IL-12 항체를 각각 200 내지 400U/ml, 5 내지 20ng/ml, 5 내지 20ng/ml, 5 내지 20 μ g/ml 및 5 내지 20 μ g/ml의 농도로 첨가된 배지에서 72시간 내지 120시간동안 배양하는 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 제1형 CD4+ T 세포는 자가면역질환을 유발하는 세포임을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제1항의 제조방법에 의해 제조된 제2형 CD4+ T 세포.

청구항 7

제6항의 제2형 CD4+ T 세포를 유효성분으로 포함하는 자가면역질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 자가 면역질환은 류마티스 관절염(Rheumatoid Arthritis), 다발성 신경염(Multiple Sclerosis), 제1형 당뇨병(Immune-Mediated or Type 1 Diabetes Mellitus), 염증성 장질환 (Inflammatory Bowel Diseases), 크론씨 병(Crohn's disease), 전신성 홍반성 낭창(Systemic Lupus Erythematosus), 소양증(Psoriasis), 피부병변(Scleroderma), 자가면역성 갑상선 질환 (Autoimmune Thyroid Diseases), 중증 근무력증(myasthenia gravis) 및 장기이식에 의한 거부반응으로 이루어지는 군에서 선택된 것임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

- (a) 제1형 CD4+ T 세포를 사이클로스포린 A(cyclosporin A)를 포함하는 배지에서 배양하는 단계;
- (b) 상기 (a) 단계에서 배양된 세포를 마우스 인슐린 성장 유사인자 I(mouse insulin growth like factor-I)를 포함하는 배지에서 배양하는 단계; 및
- (c) 상기 (b) 단계에서 배양된 세포를 항원, IL-4(interleukin-4), IL-2, 항-IFN γ 항체 및 항-IL-12 항체를 포함하는 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 제1형 CD4+ T 세포를 제2형 CD4+ T 세포로 변화시키는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <4> 본 발명은 제1형 CD4+ T-세포를 제2형 CD4+ T-세포로 변환시키는 방법 및 이의 용도에 관한 것으로서 보다 상세하게는 제1형 CD4+ T 세포에 사이클로스포린 A(cyclosporin A), 마우스 인슐린 성장 유사인자 I(mouse insulin growth like factor-I), 항원, IL-4(interleukin-4), IL-2, 항-IFN γ 항체 및 항-IL-12 항체로 처리하여 제1형 CD4+ T-세포를 제2형 CD4+ T-세포로 변환시키는 방법 및 이의 용도에 관한 것이다.
- <5> 체내에 항원이 유입되면, 다양한 면역반응이 일어난다. 이러한 면역반응에 관여하는 세포 중 하나가 CD4+ T-세포인데, 우리 몸의 CD4+ T 세포는 제1형(Th1)과 제2형(Th2)으로 크게 구분이 되고 이들은 서로 다른 작용기작을 하며 면역반응에 관여한다. 제1형 세포는 감염원인을 제거하는 방법으로 염증을 일으키고 식균작용을 강화하고 세포독성 T 세포를 활성화시키며, 반면 제2형 세포는 주로 항체 반응을 일으켜서 감염균이 항체에 의해 결합되면 신속히 식균작용으로 제거할 수 있도록 해 준다. 이와 같은 두 종류의 세포는 서로가 서로에 대해 억제작용을 하여 감염균의 종류에 따라 제1형 혹은 제2형 어느 것이 더 효과적인 제거방법이라는 판단이 서면 다른 타입이 작용하는 것을 억제하고 효과적으로 병원균을 제거하게 된다.
- <6> 그런데, 감염균이 아니라 자기 자신의 단백질 항원에 대해 T 세포들이 반응을 보이는 경우가 병적으로 생길 수 있는데 이 경우 자가 면역 질환이 된다. 즉, 자가 면역질환은 환자의 유전자에 의해 정상적으로 발현되는 단백질을 면역세포가 공격대상으로 인식하여 항체를 만들거나 T 세포 반응을 일으켜서 정상조직을 파괴하는 질환으로서, 다발성 경화증, 류마티스성 관절염, 제1형 당뇨병 등 많은 형태의 자가 면역질환이 알려져 있다. 자가 면역질환은 주로 제1형 CD4+ T세포가 자신의 조직을 인식해서 염증성 반응을 일으키기 때문에 정상적인 기능을 수행해야할 조직이 파괴되고, 파괴된 조직이 원래 수행해야할 기능이 손상(예를 들면 인슐린의 분비, 혹은 신경세포의 파괴로 인한 거동 불편 등)됨으로써 치명적인 질환으로 발전해 간다.
- <7> 자가 면역질환의 발병원인은 아직도 완전히 확립되지 않았으며 단일한 원인에 의해 발생하는 것이 아니라 여러 가지 유전적, 환경적요인 및 개인의 면역적 환경에 의해서 결정된다. 따라서 발병 원인을 미리 제거하여 질병의 위험을 회피하는 것은 현실적으로 불가능하다.
- <8> 아울러, 자가 면역질환의 원인이 되는 자가 면역 T세포 만을 제거할 수 있는 방법이 없고 또 비록 거의 대다수의 원인 T세포를 제거한다고 하더라도 항원이 남아있는 한 다시 증식하여 원래의 수로 돌아오게 되므로 원인 세포를 약물 등을 이용해서 선택적으로 제거하는 것은 현실적으로 불가능한 실정이다. 현재까지 유용하게 사용되는 방법은 모든 T 세포를 억제하는 면역억제제를 사용하는 것인데 이것은 환자를 면역결핍상태에 빠뜨리므로 그 자체로 많은 문제를 지니고 있다.
- <9> 따라서, 분화된 제1형 CD4+ T 세포를 제2형 CD4+ T 세포로 재 분화시켜 이를 이용하려는 시도가 있어 왔다. 하지만, 항원을 인식하고 작용을 개시한 CD4+ T 세포는 비록 그것이 자가 항원이든 병원균 항원이든 완전히 분화된 세포이기 때문에 이를 인위적으로 재 분화시키려는 것은 기술적인 어려움이 있는 실정이다. Arai Naoko 그룹(Journal of Experimental Medicine, 2000, 7 Vol 192, 105115)은 분화된 제1형 CD4+ T 세포에서 제2형 CD4+ T 세포로 형질변환 시키는 방법으로, 레트로바이러스를 이용한 유전자 삽입 방법을 사용하였는데, 이 방법은 질병유발세포에 인위적으로 GATA-3 유전자를 삽입하는 방법으로 시간과 노력이 많이 들뿐 아니라 유전자 조작된 세포의 인체도입으로 안전성에 큰 문제가 있다. 또한 이미 제1형 세포로 분화된 세포에는 분화되고 있는 세포에 비해 그 효과가 미미하며, 확립된 세포 역시 세포내의 전사인자(GATA-3)의 발현이 조절되는 것이 아니라 강제로 주입한 유전자에 의해 조절되는 것이기에 불안정성을 가져 실용화가 어려운 단점이 있다.
- <10> 이에, 본 발명자들은 제1형 CD4+ T세포를 제2형 세포로 바꿀 수가 있다면 자가면역 환자들의 병적인 제1형 CD4+ T 세포들을 제2형 세포로 바꿔서 몸속에 남아있는 제1형 세포의 작용을 억제 시킬 수 있을 것이라는 점에 착안하여 연구를 지속한 결과, 제1형 CD4+ T 세포에 사이클로스포린 A(cyclosporin A), 마우스 인슐린 성장 유사인자 I(mouse insulin growth like factor-I), 항원(본원발명에서는 OVA(ovalbumin) 단백질), IL-4(interleukin-4), IL-2, 항-IFN γ 항체 및 항-IL-12 항체로 처리하여 제1형 CD4+ T-세포를 제2형 CD4+ T-세포로 형질을 변환시킬 수 있다는 점을 알아내어 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- <11> 따라서, 본 발명의 목적은 제1형 CD4+ T-세포를 제2형 CD4+ T-세포로 변환시키는 방법 및 이의 용도를 제공하는

것이다.

발명의 구성 및 작용

- <12> 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 제1형 CD4+ T-세포를 처리하여 제2형 CD4+ T-세포를 제조하는 방법을 제공한다.
- <13> 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 제2형 CD4+ T-세포를 제공한다.
- <14> 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 본 발명의 방법에 의해 제조된 제2형 CD4+ T-세포를 유효성분으로 포함하는 자가면역질환 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.
- <15> 아울러, 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 제1형 CD4+ T-세포를 처리하여 제2형 CD4+ T-세포로 변화시키는 방법을 제공한다.
- <16> 이하 본 발명의 내용을 보다 상세히 설명하기로 한다.
- <17> 본 발명의 제2형 CD4+ T-세포의 제조방법은 제1형 CD4+ T-세포를 이용하여 다음의 배양 방법에 의하는 것을 특징으로 한다.
- <18> 본 발명의 제2형 CD4+ T-세포의 제조방법은
- <19> (a) 제1형 CD4+ T 세포를 사이클로스포린 A(cyclosporin A)를 포함하는 배지에서 배양하는 단계;
- <20> (b) 상기 (a) 단계에서 배양된 세포를 마우스 인슐린 성장 유사인자-I(mouse insulin growth like factor-I)을 포함하는 배지에서 배양하는 단계; 및
- <21> (c) 상기 (b) 단계에서 배양된 세포를 항원, IL-4(interleukin-4), IL-2, 항-IFN γ 항체 및 항-IL-12 항체를 포함하는 배지에서 배양하는 단계를 포함한다.
- <22> 상기 (a) 단계에서 배양은 공지된 T 세포 배양배지에 사이클로스포린 A(Cyclosporin A) 첨가 후 당업계에 공지된 통상적인 배양방법에 의할 수 있으나, 바람직하게는 배양배지에 2 내지 3 μ M의 농도로 사이클로스포린 A를 첨가하여 10 내지 20분간 배양할 수 있으며, 더 바람직하게는 배양배지에 2.5 μ M의 농도로 사이클로스포린 A를 첨가하여 37℃에서 15분동안 배양할 수 있다. 면역억제제인 사이클로스포린 A는 제1형 세포의 분화를 억제시키고, 제2형 세포의 사이토카인 유전자위(gene loci)에서 억제자(suppressor)로 작용하고 있는 전사인자의 활성을 불용화시킬 것으로 보인다. 배양배지는 공지된 T 세포 배양배지라면 제한없이 사용할 수 있으나, 바람직하게는 RPMI1640 배지 또는 RPMI1640 배지에 10% 열불활성화 우태아혈청(heat inactivated FBS), 2mM 중탄산나트륨(sodium bicarbonate), 2mM L-글루타민, 5 μ M β -머캅토에탄올(mercaptoethanol) 및 항생제를 첨가한 배지를 사용할 수 있다.
- <23> 상기 (b) 단계에서 생쥐 인슐린 성장 유사 인자-I(mouse insulin growth like factor-I) 첨가 후 배양은 당업계에 공지된 통상적인 배양방법에 의할 수 있으나, 바람직하게는 배양배지에 10 내지 30ng/ml의 농도로 생쥐 인슐린 성장 유사 인자-I를 처리하여 20 내지 40분동안 배양할 수 있으며, 더 바람직하게는 20ng/ml의 농도로 생쥐 인슐린 성장 유사 인자-I를 첨가하여 37℃에서 30분동안 배양할 수 있다. 사이클로스포린 A의 처리 후, 순차적으로 인슐린 성장 유사 인자-I(Insullin growth like factor-I)을 처리하면, 후성적인(epigenetic) 변화를 유도하여 히스톤(histone)의 변형을 가져와 제2형 사이토카인의 유전자위의 전사가 가능하도록 세포 내 환경을 조성해 주는 것으로 보인다.
- <24> 상기 (c) 단계에서 항원, IL-4(interleukin-4), IL-2, 항-IFN γ 항체 및 항-IL-12 항체의 첨가 후 배양은 당업계에 공지된 통상적인 배양방법에 의할 수 있으나, 바람직하게는 배양배지에 항원, IL-4(interleukin-4), IL-2, 항-IFN γ 항체 및 항-IL-12 항체를 각각 200 내지 400U/ml, 5 내지 20ng/ml, 5 내지 20ng/ml, 5 내지 20 μ g/ml 및 5 내지 20 μ g/ml의 농도로 첨가하여 72시간 내지 120시간동안 배양할 수 있으며, 더 바람직하게는 배양배지에 항원, IL-4(interleukin-4), IL-2, 항-IFN γ 항체 및 항-IL-12 항체를 각각 300U/ml, 10ng/ml, 10ng/ml, 10 μ g/ml 및 10 μ g/ml의 농도로 첨가하여 37℃에서 96시간동안 배양할 수 있다. 아울러, 항원은 본 발명의 방법이 항원에 특이적으로 적용되지 않으므로 각각의 모든 항원에 특이적인 각각의 CD4+ T세포에 적용이 가능하며, 이에 한정되지는 않으나, 바람직하게는 자가면역질환의 대상이 되는 콜라겐(collagen), 미엘린 베이스 단백질(myelin basic protein)과 같은 항원일 수 있다. 아울러, 상기 (c) 단계의 배양은 1회만 수행할 수도 있으나 형질변환 효율을 높이기 위해 2회이상 반복하여 수행할 수도 있다.

- <25> 이와 같은 항원 및 사이토카인의 처리는 상기 (b) 단계에서 임시적으로 미분화 상태로 유도한 세포에 대해서 제2형 CD4+ T 세포로 분화되도록 유도하는 역할을 할 것으로 보인다.
- <26> 상기한 바와 같이 반복적인 항원제시세포에 의한 자극에 의해 제1형 CD4+ T 세포로 분화된 세포는 면역억제제인 사이클로스포린 A (cyclosporin A), 생쥐 인슐린 성장 유사 인자 I 및 싸이토카인을 이용한 본 발명의 방법에 의해 제2형 세포로 형질전환을 유도할 수 있다.
- <27> 본 발명의 이러한 방법은 인위적으로 유전자 삽입을 해 줄 필요가 없이 세포 자체의 후성적인(epigenetic) 변화와 전사인자의 발현의 변화를 유도함으로써 형질 변화된 세포를 안정적으로 유지 배양할 수 있다. 또한 이 방법은 체외에서 형질 변환된 세포를 손쉽게 대량 배양이 가능함으로써 충분한 양의 세포를 체내로 공급할 수 있는 기회를 극대화 할 수 있다.
- <28> 따라서, 본 발명은 형질을 변화시키기 위해서 유전자를 도입하지 않기 때문에 인위적인 유전자 도입의 위험성을 원천적으로 제거하였으며, 세포 자체의 후성적인 변화와 전사인자의 발현의 변화를 유도함으로써 제2형으로 변환된 CD4+ T 세포가 다른 외부적 요인에 의해 그 형질이 다시 변화되지 않도록 완전히 분화된 상태를 유도하였다.
- <29> 따라서, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 제2형 CD4+ T 세포를 제공한다.
- <30> 본 발명에 의해 제공되는 제2형 CD4+ T 세포는 내생적으로 동일 항원에 대한 제1형 CD4+ T 세포의 작용을 억제하므로 제1형 CD4+ T 세포에 의해 유발된 자가 면역 치료 또는 장기 이식시 공여자의 장기를 항원으로 인식하는 제1형 CD4+ T 세포의 작용을 억제할 수 있다. 즉, 류마티즘 관절염이나 다발성 경화증, 제1형 당뇨병과 같은 자가 면역질환은 자가 항원을 인식하는 제1형 CD4+ T 세포에 의해 매개되어 지는데 이와 같은 자가 항원 특이 제1형 CD4+ T 세포의 활성을 병증 부위에서 억제할 수 있는 세포는 동일한 항원특이성을 지닌 제2형 CD4+ T 세포이므로 이를 유도하는 경우 모든 자가 면역질환의 치료에 이용가능하다. 아울러, 장기 이식의 경우 공여자 장기의 항원을 인식하는 제1형 CD4+ T 세포는 공여된 장기에 심각한 조직파괴 염증을 유도하는데 이를 억제하기 위해 현재는 광범위한 면역억제제가 사용된다. 따라서 공여 장기를 인식하는 제1형 CD4+ T 세포를 제2형으로 전환시킴으로써 제1형세포가 일으키는 조직파괴 반응을 억제할 수 있으므로 다양한 종류의 타인 조직이식 수술에서 면역억제제의 기능을 대체 또는 보조하여 이용될 수 있다.
- <31> 본 발명의 일 실시예 에서는 생쥐에서 각각 CD4+ T 세포 및 수지상 세포를 분리하여, CD4+ T 세포를 제1형 CD4+ T 세포로 분화하도록 배양하고, 분화여부를 플로우 사이토메트리 및 ELISA로 확인하였다. 그 결과, 분화된 제1형 CD4+ T 세포는 인터페론 감마를 발현하고, 인터류킨-4는 발현하지 않는 것으로 나타나 분화가 잘 이루어졌음을 알 수 있었다.
- <32> 본 발명의 다른 실시예에서는 분화된 제1형 CD4+ T 세포를 본 발명의 방법에 따라 제2형 CD4+ T 세포로 다시 분화하도록 배양하고, 그 분화여부를 플로우 사이토메트리, ELISA 및 크로마틴 면역 침강법으로 확인하였다. 그 결과, 제2형 CD4+ T 세포로 분화가 유도된 세포는 인터페론 감마의 발현이 감소하고, 인터류킨-4의 발현이 증가하여 제1형 CD4+ T 세포에서 제2형 CD4+ T 세포로 형질변환이 이루어졌음을 알 수 있었다. 아울러, 크로마틴 면역 침강법에 의하여 이러한 변화가 외부에서 넣어준 물질들이 인공적으로 사이토카인의 발현 조절을 유도하는 것이 아니라 내부의 후생적인 변화가 안정적으로 유도된 것으로써 제2형 분화에 관련된 세포 내의 전사인자 등이 자연스럽게 유도된 것임을 알 수 있었다. 결론적으로 본 발명의 세포 배양방법을 통해 제1형 CD4+ T 세포가 외부의 유전자 도입 없이 정상적인 제2형 CD4+ T 세포의 유전자 발현 패턴을 보이고 또 이 상태가 안정적으로 유지됨을 확인하였다.
- <33> 따라서, 본 발명은 본 발명의 제조방법에 의해 제조된 제2형 CD4+ T 세포를 유효성분으로 포함하는 자가 면역질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- <34> 상기에서 자가 면역질환은 류마티스 관절염(Rheumatoid Arthritis), 다발성 신경염(Multiple Sclerosis), 제1형 당뇨병(Immune-Mediated or Type 1 Diabetes Mellitus), 염증성 장질환 (Inflammatory Bowel Diseases), 크론씨 병(Crohn's disease), 전신성 홍반성 낭창(Systemic Lupus Erythematosus), 소양증(Psoriasis), 피부병변(Scleroderma), 자가면역성 갑상선 질환 (Autoimmune Thyroid Diseases), 중증 근무력증(myasthenia gravis) 및 장기이식에 의한 거부반응을 포함한다.
- <35> 본 발명에 따른 약학적 조성물은 제2형 CD4+ T 세포를 단독으로 함유하거나 또는 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 함유할 수 있다. 상기에서 '약학적으로 허용되는'이란 생리학적으로

허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다.

<36> 본 발명의 자가 면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 포유동물에 어떠한 방법으로도 투여할 수 있다. 예를 들면, 경구 또는 비경구적으로 투여할 수 있다. 비경구적인 투여방법으로는 이에 한정되지는 않으나, 경피 투여, 피하 내, 정맥 내, 근육 내 또는 복강 내 투여할 수 있다. 바람직하게는 본 발명의 약학적 조성물은 정맥 내에 투여될 수 있다.

<37> 본 발명의 약학적 조성물은 상술한 바와 같은 투여 경로에 따라 경구 투여용 또는 비 경구 투여용 제제로 제형화 할 수 있다. 나아가, 본 발명의 약학적 조성물은 항 응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다. 이들 제형은 모든 제약 화학에 일반적으로 공지된 처방서인 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, 15th Edition, 1975. Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania 18042, Chapter 87: Blaug, Seymour)에 기재되어 있다.

<38> 본 발명의 제2형 CD4⁺ T 세포의 총 유효량은 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 자가 면역질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있다. 바람직하게 본 발명의 약학적 조성물의 바람직한 전체 용량은 1일당 환자 당 약 110^6 내지 110^{12} 세포 더 바람직하게는 510^8 내지 510^9 세포일 수 있다. 그러나 상기 용량은 투여 경로 및 치료 횟수 뿐만 아니라 환자의 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 질환의 중증도, 식이 및 배설율등 다양한 요인들을 고려하여 결정되는 것이므로, 이러한 점을 고려할 때 당 분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 본 발명의 효과를 보이는 한 그 제형, 투여 경로 및 투여 방법에 특별히 제한되지 아니한다.

<39> 이하, 본 발명을 실시 예에 의해 상세히 설명한다.

<40> 단, 하기 실시 예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시 예에 한정되는 것은 아니다.

<41> <실시예 1>

<42> CD4⁺ T 세포 및 CD11c⁺ 수지상 세포 분리

<43> <1-1> CD4⁺ T 세포의 분리

<44> OT-II 형질전환 생쥐(Jackson laboratory, USA)로부터 비장을 적출한 후 나일론(nylon) 망을 사용하여 단독세포(single cell)로 분리하였다. 이 후 상용의 CD4 세포 분리용 비드(anti-CD4 magnetic bead; Miltenyli biotech, 독일)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 MACS column (Miltenyli biotech, 독일)를 통해 CD4⁺ T 세포를 분리하였다.(Coulson, PS; Wilson, RA (1993) J. Immunol. 151: 3663-3671.)

<45> <1-2> CD11c⁺ 수지상 세포의 분리

<46> 한편, C57/BL6 생쥐(오리엔트 바이오, 한국)로부터 비장을 적출한 후 나일론(nylon) 망을 사용하여 단독세포(single cell)로 분리하였다. 이 후 상용의 CD11c 수지상세포 분리용 비드(anti-CD11c magnetic bead, Miltenyli biotech, 독일)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 MACS column (Miltenyli biotech)를 통해 CD11c⁺ 수지상 세포를 분리하였다.

<47> <실시예 2>

<48> 나이프(naive) CD4⁺ T 세포로부터 제1형 CD4⁺ T 세포로 분화

<49> <2-1> 제1형 CD4⁺ T 세포로의 분화

<50> RPMI1640(Gibco BRL, 미국)에 10% 열불활성화 우태아혈청(heat inactivated FBS, Hyclone, 미국), 2mM 중탄산나트륨(sodium bicarbonate, Sigma), 2mM L-글루타민(Gibco BRL), 5 μ M β -머캅토에탄올(mercaptoethanol, Sigma), 항생제 콕테일(antibiotics cocktail, Gibco BRL)를 첨가한 배지에 상기 실시예 <1-1> 및 <1-2>에서 분리한 세포를 잘 풀어준 후 24 웰 플레이트에 수지상세포($210^5/500\mu$ l/well, 2000rad 방사선 조사) 및 CD4⁺ T 세포($310^5/500\mu$ l/well)를 혼합하였다. 여기에 10 μ M OVA 329-334 펩티드(Genescript), 10ng/ml IL-12 (Peprotech), 10ng/ml IL-2 (Peprotech), 10 μ g/ml 항-IL-4 (11B11) 항체를 각각의 웰에 첨가하여 잘 섞어주고

5% CO₂, 37℃에서 4일 동안 배양하였다. 첫 번째 배양 후 배양된 세포를 다시 위와 같은 방법으로 1회 더 반복하여 4일 동안 세포를 배양하여 나이브 CD4+ T 세포를 제1형 CD4+ T 세포로 배양하였다.

<51> <2-2> 플로우 사이토메트리를 통한 분화 확인

<52> 자가 면역질환에 관여하는 CD4+ T 세포는 제1형과 제2형으로 나뉘어 있는데 제1형의 경우 인터페론 감마라는 사이토카인을 대표적으로 분비하고 이를 통해 세포독성 CD8+ T 세포와 자연 살해 세포 등을 활성화 시킨다. 이에 반해 제2형 세포는 인터루킨-4, 인터루킨-10등의 사이토카인을 분비한다. 제1형과 제2형의 T 세포의 균형은 다양한 면역반응에 매우 중요하다. 이에 분화된 T 세포의 타입을 플로우 사이토메트리를 통해 확인하였다.

<53> 세포를 배양한 후 마지막 5시간 동안 골지 종료 용액(Golgi stop solution, BD pharmingen, 미국)을 넣어준 후 분화된 CD4+T 세포를 1FACS buffer(1% Bovine Serum Albumine, 0.01% NaN₃ in PBS)로 2회 씻어준 후 50μl 1FACS buffer에 잘 섞어 주었다. 이를 2μg/ml 항-FcR(24.G2) 항체(anti-FcR(24.G2) antibody, ascite fluid)로 얼음에서 20분간 배양한 후 세포 표면의 염색을 위해서 2μg/ml 항-CD4 항체-FITC(anti-CD4 antibody-FITC, BD pharmingen)와 2μg/ml 항-TCRβ 항체-CYC(anti-TCRβ antibody-CYC, BD pharmingen)를 넣어주고 얼음에서 30분간 배양하였다. 이를 1FACS buffer로 2회 씻어준 후 세포 내부의 사이토카인을 측정하기 위해서는 상용의 키트(Cytoperm/Cytofix kit, BD pharmingen)를 사용하여 제조사에 지침(Jung T. et al, 1993, *J. Immunol. Meth.* 159:197-207)에 따라 0.5μg/ml 항-IFNγ 항체-PE(anti-IFNγ antibody-PE, BD pharmingen), 1μg/ml 항-IL4 항체-APC(anti-IL4 antibody-APC, BD pharmingen)와 같이 플로우 싸이토메트리(flow cytometry, BD bioscience)를 사용하여 염색된 세포를 분석하였다.

<54> 그 결과, 도 1A에서 보듯이, 제1형 CD4+ T 세포로의 분화를 통해 분화된 T 세포가 인터페론 감마를 잘 분비하고, IL-4는 분비하지 않음을 알 수 있어 유전적으로 제1형 CD4+ T 세포로 분화되도록 운명 지워진 형질전환 CD4+ T세포 클론들(OT-II)을 반복적인 항원자극을 통해 제1형 CD4+ T 세포로 완전히 분화시켰음을 알 수 있었다.

<55> <2-3> ELISA를 통한 분화 확인

<56> 96웰 ELISA 플레이트(Nunc)에 탄산염 버퍼(carbonate buffer)로 희석한(1) 코팅 항체(coating antibody, 1000, BD pharmingen)를 50μl/well로 넣어준 후 4℃에서 12~16시간 동안 놓아 두었다. ELISA 세척 버퍼(washing buffer, 0.03% Tween 20 (Sigma) in PBS buffer)로 1회 씻어 주고, 5% 우태아혈청(Bovine serum albumine, BSA)을 100μl/well로 넣어 준 후 37℃에서 2시간 동안 놓아 두었다. 다시 ELISA 세척 버퍼로 1회 씻어 준다. 각각의 분화된 CD4+ T세포의 배양액을 3개 웰을 한 그룹으로 하여 50μl/well로 넣어 주었다. 37℃에서 1시간 동안 놓아 둔 후 ELISA 세척 버퍼로 3회 씻어 주었다. 5% BSA로 각각 희석한(1) 검출 항체(Detecting antibody, 1000, BD pharmingen) 및 스트렙타비딘-HRP 용액(Streptavidin-Horse radish peroxidase solution, 500, BD pharmingen)를 50μl/well로 넣어준 후 37℃에서 30분 동안 놓아 두었다. ELISA 세척 버퍼로 4회 씻어 준 후 TMB 용액(BD pharmingen)을 15분간 넣어 준 후 2.5mM 황산 용액(Sigma)으로 HRP 반응을 중지 시킨다. ELISA 리더(Bio-Rad)로 450nm에서 측정하여 표준 값과 비교하여 사이토카인 양을 결정하였다. 표준 값은 정량된 재조합 싸이토카인(BD pharmingen)을 2μg/ml부터 5% BSA에 1/2씩 순차적으로 희석하여 측정하였다.

<57> 그 결과, 도 1B에서 보듯이 제1형 CD4+ T 세포로의 분화를 통해 분화된 T 세포가 인터페론 감마를 잘 분비하고, IL-4는 전혀 분비하지 않음을 알 수 있어 제1형 CD4+ T 세포로의 분화가 잘 이루어졌음을 알 수 있었다.

<58> <실시예 3>

<59> 제1형 CD4+ T 세포로부터 제2형 CD4+ T 세포로 분화

<60> 상기 실시예 2에서 분화된 제1형 CD4+ T 세포를 PBS(phosphate buffer saline)로 씻어준 후 RPMI1640(Gibco BRL, 미국)에 10% 열불활성화 우태아혈청(heat inactivated FBS, Hyclone, 미국), 2mM 중탄산나트륨(sodium bicarbonate, Sigma), 2mM L-글루타민(Gibco BRL), 5μM β-머캅토에탄올(mercaptoethanol, Sigma), 항생제 콕테일(antibiotics cocktail, Gibco BRL)를 첨가한 배지에 310⁵/1ml의 농도로 CD4+ T 세포를 풀어준 후 2.5μM 사이클로스포린 A (Cyclosporin A) 첨가하고 37℃에서 15분간 배양하였다. 배양 후 PBS로 씻어준 후 다시 상기 배지에 310⁵/500μl의 농도로 CD4+ T 세포를 다시 풀어준 후 20ng/ml 생쥐 인슐린 성장 유사 인자-I (mouse insulin growth like factor-I)을 넣어주고 37℃에서 30분간 배양하였다. 배양 후 24 웰 플레이트에 상기 실시예 <1-2>에서 분리한 수지상세포(210⁵/500μl/well, 2000rad 방사선 조사) 및 상기에서 처리한 CD4+ T 세포

($310^5/500\mu\text{l}/\text{well}$)를 첨가하고, $10\mu\text{M}$ OVA 329-334 펩티드(Genescript), $300\text{U}/\text{ml}$ IL-4(Peprotech), $10\text{ng}/\text{ml}$ IL-2 (Peprotech), $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 항-IFN γ (XMG1.2) 항체, $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 항-IL12 (C17.8) 항체를 각각의 웰에 첨가하여 잘 섞어주고 5% CO_2 , 37°C 에서 4일 동안 배양하였다. 배양 후 PBS로 씻어준 후 24 웰 플레이트에 수지상세포 ($210^5/500\mu\text{l}/\text{well}$, 2000rad 방사선 조사)와 CD4^+ T 세포($310^5/500\mu\text{l}/\text{well}$)를 $10\mu\text{M}$ OVA 329-334 펩티드 (Genescript)를 넣어주고 2일 동안 배양하여 제2형 CD4^+ T 세포로의 형질변환을 유도하였다.

<61> 대조군으로는 상기 방법에서 사이클로스포린 A 및 생쥐 인슐린 성장 유사 인자-I를 처리하지 않은 것을 제외하고는 상기 형질변환 유도방법과 동일하게 한 것을 사용하였다.

<62> <실시예 4>

<63> 형질변환 여부 확인

<64> 상기 실시예 3에서 유도한 제2형 CD4^+ T 세포로의 형질변환이 제대로 이루어졌는지 확인하기 위하여, 다음과 같이 플로우 사이토메트리(Flow cytometry), ELISA(Enzyme Linked Immunosorbent assay) 및 크로마틴 면역침강법(Chromatin immunoprecipitation)을 통해 확인하였다.

<65> <4-1> 플로우 사이토메트리를 통한 형질변환여부 확인

<66> 플로우 사이토메트리는 상기 실시예 <2-2>에서와 같이 측정하여 형질변환여부를 확인하였다.

<67> 그 결과, 도 2A에서 보듯이, 본 발명의 형질변환 방법에 의해 형질변환된 세포는 인터페론 감마의 양이 감소하고, IL-4의 양이 증가하는 것을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 제1형 CD4^+ T 세포가 제2형 CD4^+ T 세포로 분화되었음을 나타낸다.

<68> <4-2> ELISA에 의한 형질변환여부 확인

<69> ELISA는 상기 실시예<2-3>에서와 같이 수행하여 형질변환여부를 확인하였다.

<70> 그 결과, 도 2B에서 보듯이 제1형 CD4^+ T 세포에서 분비되는 인터페론 감마는 그 분비가 감소되고, 제1형 CD4^+ T 세포에서 분비되지 않는 IL-4는 그 분비가 증가됨을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 본 발명의 방법에 의하여 제1형 CD4^+ T세포가 제2형 CD4^+ T세포로 안정적으로 형질전환 됨을 나타낸다.

<71> <4-3> 크로마틴 면역침강법에 의한 형질변환여부 확인

<72> 또한 CD4^+ T 세포에 있어서 제1형 세포와 제2형 세포의 분화과정에 있어서는 후성적인 변화(epigenetic change)가 동반된다. 후성적인 변화 중 히스톤 단백질의 변형이 대표적인 예로, 히스톤 단백질 H3, H4 꼬리부분의 특정 아미노산에 아세틸화, 메틸화, 인산화가 일어난다. CD4^+ T 세포의 제1형, 제2형 분화과정 내에서는, 히스톤 단백질의 아미노산에 아세틸기 결합이 가장 널리 알려져 있다. 제1형으로 분화되게 되면 제1형 사이토카인 유전자위에 아세틸기가 결합한 히스톤이 관여하여 전사를 유도하고, 제2형으로 분화되게 되면 제2형 사이토카인 유전자위에 아세틸기가 결합한 히스톤이 관여하여 전사를 유도한다. 최근의 발표에 따르면 히스톤 단백질 H3의 특정아미노산(Lysine27)의 삼중 메틸기의 결합은 제1형으로 분화된 세포에서 제2형 세포의 사이토카인 유전자위에 관여하여 제2형 세포에 관여하는 유전자의 전사를 억제하는 것으로 알려져 있다.

<73> 형질전환 된 세포의 후생적인 변화를 확인하기 위해서 다음과 같이 염색체 면역침강법을 사용해서 형질전환된 세포와 제1형 CD4^+ T 세포의 염색체의 인터페론 감마와 인터루킨-4의 프로모터(promoter) 부위에서 히스톤의 변화 양상을 관찰하였다: 튜브에 510^6 세포를 10ml RPMI 배지에 희석 시킨 후, $540\mu\text{l}$ 18.5% 포름알데히드(formaldehyde)를 첨가하였다. 상온에서 튜브를 천천히 돌리면서 20분간 놓아 두었다. $500\mu\text{l}$ 2.5M 글리신(glycine)을 첨가하고 상온에서 5분간 두었다. 얼음에서 5분간 식힌 후, 원심 분리하여 세포만 모았다. 이를 항-아세틸 H3 항체(anti-Acetyl H3 antibody, Upstate), 항-트리메틸 H3 항체(anti-Trimethyl H3(Lys27) antibody, Upstate), ChIP 분석 키트(chromatin immunoprecipitation(ChIP) assay kit, Upstate)를 사용하여 제조사에 지침에 따라 다음과 같이 실험을 수행 하였다.(Luo RX et al., 1998, Cell 92: 463-473).

<74> 분리된 히스톤-염색체 복합체의 크로스링크(crosslink)를 풀어주기 위해 $20\mu\text{l}$ 5M NaCl를 분리된 히스톤-염색체 복합체($500\mu\text{l}$)에 넣어주고 65°C 에서 4시간 동안 반응시켰다(incubation). $10\mu\text{l}$ 0.5M EDTA, $20\mu\text{l}$ 1M Tris-HCl(pH 6.5), $2\mu\text{l}$ $10\text{mg}/\text{ml}$ proteinase K의 반응액에 $500\mu\text{l}$ 의 시료를 넣어주고 45°C 에서 1시간 배양하여 히스톤 단백질을 제거하였다. 시료와 같은 부피의 페놀/클로로포름(1:1) 용액을 처리한 다음 원심분리 후 상층액을 모았다. 100% 에탄올 1ml 와 전체 부피의 $1/10$ 의 3M 아세트산 나트륨(sodium acetate, pH5.2)을 넣어 섞어 준

후 -80℃에서 10분 이상 넣어두었다. 원심분리 후 다시 상층액을 버렸다. 70% ethanol 1ml로 씻어 준 후 에탄올을 제거하고, 침전된 염색체를 PCR 반응에 사용하였다.

<75> 분리된 염색체를 서열번호 1(Sense, 5'-GCT CTG TGG ATG AGA AAT-3') 및 서열번호 2(Antisense, 5'-AAG ATG GTG ACA GAT AGG-3')의 IFN γ 프로모터에 대한 프라이머 및 서열번호 3(Sense, 5'-TTG GTC TGA TTT CAC AGG-3') 및 서열번호 4(Antisense, 5'-AAC AAT GCA ATG CTG GCA-3')의 IL-4 프로모터에 대한 프라이머를 각각 이용하여 PCR를 수행 하였다. PCR은 94℃에서 5분간의 변성 후 94℃ 30초, 52℃ 30초, 72℃ 30초의 30회 반복 및 72℃에서 5분간의 반응의 조건으로 수행하였다. PCR 산물은 1.5% 아가로스 겔에서 전기영동하여 확인하였다.

<76> 그 결과, 도 3A에서와 같이 특정 프로모터의 활성화에 기여하는 아세틸화된 히스톤 H3는 제1형 세포로 분화된 그룹(형질변환되지 않은 그룹, Th1)에서는 인터페론 감마부위에서만 히스톤 H3의 아세틸화가 일어남을 볼 수 있고 형질변환된 그룹(CsA+IGF-I)에서는 인터페론 감마 지역의 아세틸화는 줄어들고 인터루킨-4 지역의 아세틸화는 증가됨을 확인할 수 있었다.

<77> 아울러, 도 3B에서 보듯이 항-트리메틸 H3(Lys27) 항체를 사용하여 확인한 결과, 제1형 세포로 분화된 그룹(Th1)에서는 인터루킨-4 지역에서 히스톤의 삼중 메틸화가 일어남을 볼 수 있고, 형질변환된 그룹(CsA+IGF-I)에서는 히스톤의 삼중 메틸화가 인터루킨-4 지역에서는 줄어들고 인터페론 감마 지역에서 늘어나는 것을 알 수 있었다.

<78> 아세틸화된 히스톤 H3는 인터페론 감마 프로모터의 활성화에 기여하고, 히스톤 H3의 삼중 메틸화는 제1형으로 분화된 세포에서 인터루킨-4 프로모터 지역의 활성을 억제하므로 이러한 사실은 본원발명에서의 제2형 세포로의 형질전환이 외부에서 넣어준 물질들이 인공적으로 사이토카인의 발현 조절을 유도하는 것이 아니라 내부의 후생적인 변화를 안정적으로 유도함으로써 제2형 분화에 관련된 세포 내의 전사인자 등을 자연스럽게 유도함을 알 수 있었다. 결론적으로 본 발명의 세포 배양방법을 통해 제1형 CD4+ T 세포가 외부의 유전자 도입 없이 정상적인 제2형 CD4+ T 세포의 유전자 발현 패턴을 보이고 또 이 상태가 안정적으로 유지됨을 확인하였다.

발명의 효과

<79> 이상 살펴본 바와 같이, 본 발명의 방법은 제1형 CD4+ T 세포를 제2형 세포로 형질변환 시키는 효과를 가진다. 따라서 본 발명의 방법 및 이를 이용하여 제조된 제2형 CD4+ T 세포는 동일한 항원에 작용하는 제1형 CD4+ T 세포의 작용을 억제하여 자가 면역 질환의 예방 및 치료의 목적으로도 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

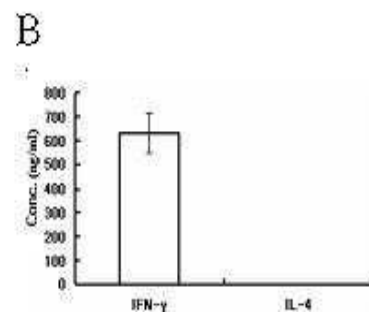
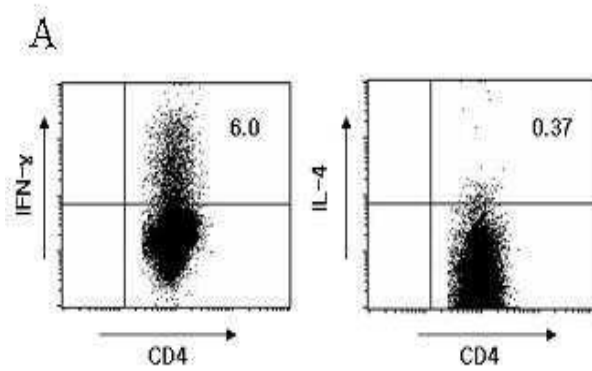
<1> 도 1은 제1형 CD4+ T 세포로 분화된 세포에서 인터페론 감마 및 IL-4의 분비량을 플로우 싸이토메트리(A) 및 ELISA(B)로 확인한 결과이다.

<2> 도 2는 제2형 CD4+ T 세포로 변환된 세포에서 인터페론 감마 및 IL-4의 분비량을 플로우 싸이토메트리(A) 및 ELISA(B)로 확인한 결과이다.

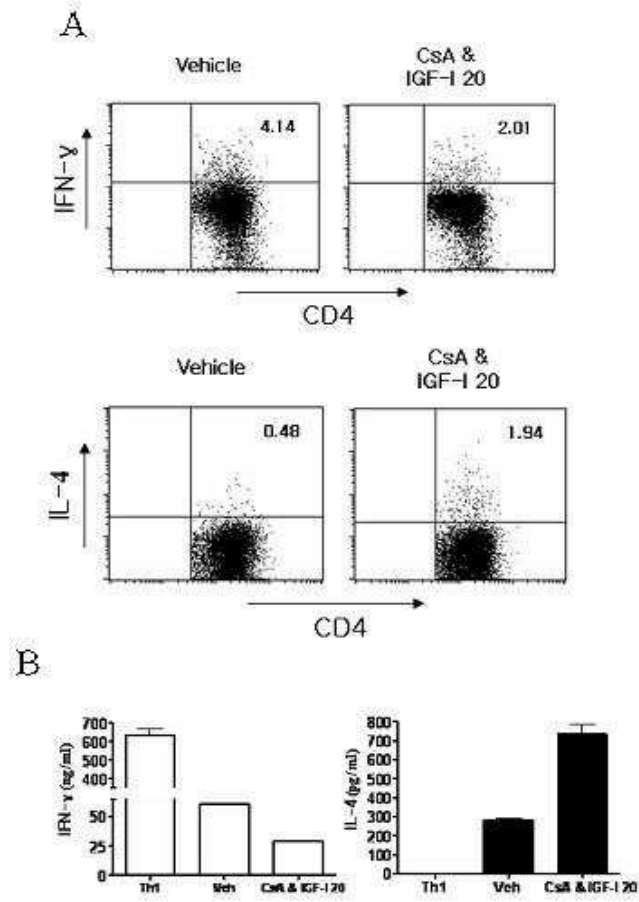
<3> 도 3은 제1형 CD4+ T 세포 및 변환된 제2형 CD4+ T 세포에서 히스톤 H3의 아세틸화(A) 및 히스톤 H3의 라이신27번의 삼중 메틸화(B) 여부를 크로마틴 침강법으로 확인한 결과이다.

도면

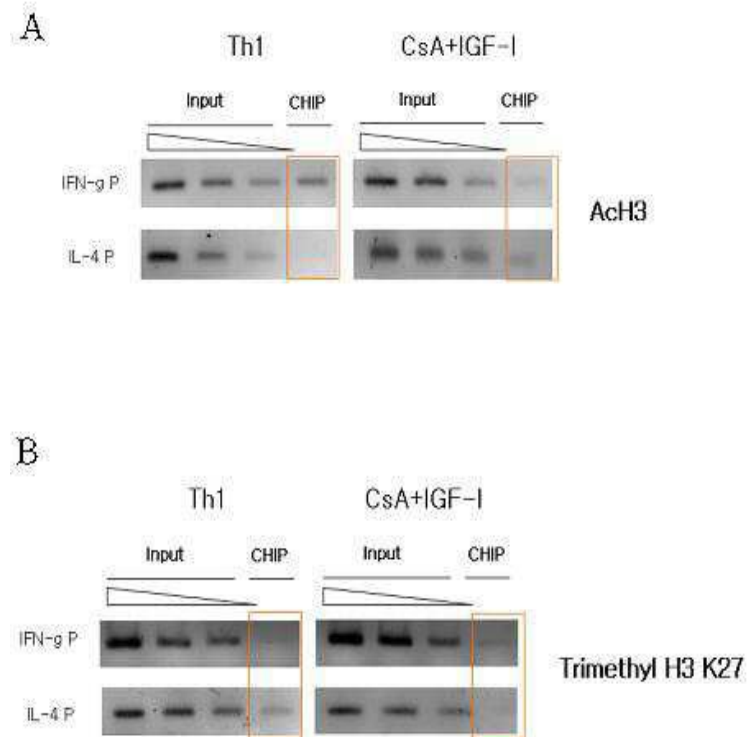
도면1



도면2



도면3



서열 목록

<110> Korea university industry & academy collaboration foundation
 <120> Method for conversion type I CD4+ T cell to type II CD4+ T cell
 and Use thereof

<130> NP07-0054

<160> 4

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> IFN γ promoter sense

<400> 1

gctctgtgga tgagaaat

18

<210> 2
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> IFNg promoter antisense

<400> 2
 aagatggtga cagatagg 18

<210> 3
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> IL-4 promoter sense

<400> 3
 ttggtctgat ttcacagg 18

<210> 4
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> IL-4 promoter antisense

<400> 4
 aacaatgcaa tgctggca 18