



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년01월04일
(11) 등록번호 10-0791996
(24) 등록일자 2007년12월28일

(51) Int. Cl.

A61K 35/66 (2006.01) A61K 35/74 (2006.01)

A61K 36/02 (2006.01) A61P 37/06 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-0072989

(22) 출원일자 2006년08월02일

심사청구일자 2006년08월02일

(56) 선행기술조사문헌

JP2003000284 A

(뒷면에 계속)

(73) 특허권자

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자

박세호

서울 성북구 돈암동 삼성아파트 106-510

홍창완

서울시 성북구 종암동 삼성 레이안 아파트 116동 1603호

오미화

서울시 송파구 송파2동 한양아파트 23동 303호

(74) 대리인

김석현, 이희숙

전체 청구항 수 : 총 7 항

심사관 : 박함용

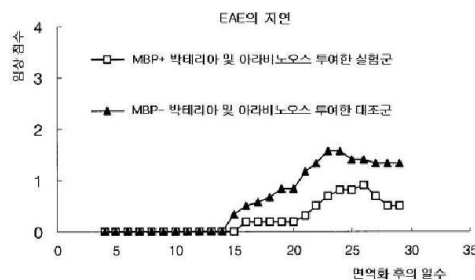
(54) 미엘린 염기성 폴리펩타이드를 분비하는 형질전환 미생물을 함유하는 자가면역질환 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 미엘린 염기성 폴리펩타이드를 분비하는 형질전환 미생물을 함유하는 자가면역질환 치료용 조성물에 관한 것으로서, 구체적으로 구강면역관용(oral tolerance)을 유도하는 미엘린 염기성 폴리펩타이드 발현 형질전환 미생물을 함유하는 자가면역질환 치료용 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 조성물은 장내(腸內)에서 미엘린 염기성 폴리펩타이드가 형질전환 미생물에 의해 만들어져서 분비되도록 하므로, 장내는 지속적으로 자가항원에 노출되어 면역조절세포와 자가항원이 접촉할 수 있는 기회를 극대화할 수 있는 효과가 있으며, 자가항원이 장내에서 직접 만들어지므로 구강을 통한 항원제공시 발생하는 투여항원의 위장 내 파괴와 같은 부작용을 억제할 수 있는 효과가 있으므로 자가면역질환 치료에 효과적으로 사용될 수 있다.

대표도 - 도3



제	종	제 리 방 법	발병률	발 병 일	질병의 정도
C57BL/6		MBP+ 박테리아 및 아라비노스 투여한 실험군	11/14	17 ± 3.9	1.8 ± 1.7
C57BL/6		MBP- 박테리아 및 아라비노스 투여한 대조군	15/15	14 ± 3.0	2.9 ± 1.1

(56) 선행기술조사문헌

KR1019990008329 A

KR1020050023347 A

W002077025 A1

W02006031727 A2

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 5, 서열번호 6 및 서열번호 7로 이루어진 항원결정기를 포함하는 미엘린 염기성 폴리펩타이드를 분비하는 형질전환 미생물을 함유하는 것을 특징으로 하는 자가면역질환 치료용 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 미엘린 염기성 폴리펩타이드는 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 미생물은 유도성 프로모터, 분비서열 및 미엘린 염기성 폴리펩타이드의 유전자가 순차적으로 작동가능하게 연결되어 있는 재조합 벡터를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 유도성 프로모터는 아라비노오스 유도성 프로모터, GAL 1 프로모터 및 MAL 1 프로모터로 이루어진 군에서 선택된 하나임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 재조합 벡터는 도 1에 기재된 개열지도를 갖는 것임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 미생물은 박테리아 또는 효모임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 자가면역질환이 다발성 경화증, 자가면역성 근위축 질환, 중증 근무력증, 다발성 근육염으로 이루어진 군에서 선택된 것임을 특징으로 하는 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<8> 본 발명은 미엘린 염기성 폴리펩타이드를 분비하는 형질전환 미생물을 함유하는 자가면역질환 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 구강면역관용(oral tolerance)을 유도하는 미엘린 염기성 폴리펩타이드 발현 형질전환 미생물을 함유하는 자가면역질환 치료용 조성물에 관한 것이다.

<9> 자가면역질환은 환자의 유전자에 의해 정상적으로 발현되는 단백질을 면역세포가 공격대상으로 인식하여 항체를 만들거나, T 세포 반응을 일으켜서 정상조직을 파괴하는 질환이다. 자가면역질환의 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.

<10> T 세포의 발생과정에서 자가항원에 강하게 결합하는 T 세포들은 모두 제거되지만 매우 약하게 결합하는 T 세포들은 이 과정에서 살아남을 수 있다. 이렇게 살아남은 T 세포들이 항원제시세포의 HLA(Human Leukocyte Antigen)에 제시되는 자가항원을 인식하더라도 첫째, 자가항원과의 결합강도가 약하고, 둘째, 감염이 없는 상태

에서는 항원제시세포가 보조활성인자를 제공하지 않기 때문에 항원을 무시하거나 혹은 항원을 인식한 이후 세포 자살 신호가 가동되어 사멸하게 된다. 보통 사람들의 경우 이런 상태가 평생 지속되지만 특정 HLA 형을 지닌 사람이 특정 감염균에 노출된 경우에는 감염균의 항원 중 자가 항원과 매우 유사한 항원이 HLA 분자에 의해 T 세포에 제시되고, 또 감염을 인식한 항원제시세포는 보조활성인자를 제공하므로 T 세포는 강력하게 활성화되어 병원균을 제거한다. 이 과정에서 한번 활성화상태가 된 T 세포는 보조 활성인자가 없이도 항원을 공격할 수 있는 능력을 획득하므로 감염이 없는 상태의 자가항원을 인식하고 공격하여 조직의 손상을 일으킨다. 이러한 자가 항원의 체내 발현 위치에 따라 각 자가면역 질환의 증세도 달라진다.

<11> 한편, 우리 신체의 일반적인 조직을 통해 전달되는 항원에 대해 체액성 혹은 세포성 면역반응이 일어나는 반면 음식물의 형태로 장을 통해 체내로 항원이 전달되는 경우는 이 항원을 인식하는 조절 T 세포가 형성되어 구강 경로가 아닌 다른 조직을 통해 전달되는 동일 항원에 대해서도 면역반응을 억제하는 현상이 생기는 데 이를 구강면역관용(oral tolerance)이라고 한다. 이 과정은 매우 적극적으로 면역반응을 조절하는 과정인데 즉, 음식물에 대한 면역반응은 생존에 매우 치명적인 결함이 되기 때문에 비록 음식물이 “자기, self”가 아님에도 불구하고 음식물 항원에 대해서는 면역반응이 일어나는 것을 억제하기 위해 이를 직접인식하고 면역억제 사이토카인인 IL-10과 TGF-beta를 분비하는 면역조절 T 세포가 형성되는 것이다.

<12> 따라서, 자가면역질환의 대상이 되는 자가항원을 순수하게 음식물의 형태로 장을 통해 공급하는 경우가 이 자가항원에 대한 면역반응(즉 자가면역질환)의 정도를 상당히 억제하는 것이 가능하며, 이를 위해 다양한 항원의 재조합 단백질 또는 펩타이드 항원을 구강을 통해 전달한 경우, 해당 항원에 대한 정상적인 면역화 과정도 억제됨이 실험 동물모델에서 보고되었고, 임상적인 시도도 일부 성공사례가 보고되었다.

<13> 구강면역관용을 통해 자가면역질환을 억제하기 위해서는 자가항원 단백질 또는 그 단백질의 해당 펩타이드를 대량으로 생산하여 음식물 형태로 제공하여야 하므로 상당한 량의 단백질 또는 펩타이드를 장기간에 걸쳐서 제공하여야 한다. 하지만, 실제 질병의 치료에 시도하기에는 비용이 지나치게 많이 소요되기 때문에 경제적으로 매우 부담스러운 방법이다. 또한, 구강을 통한 음식물 형태의 자가항원 단백질을 제공하는 경우, 단백질의 대부분은 위장을 통과하는 과정에서 면역조절 세포가 인식할 수 있는 형태보다 훨씬 작은 펩타이드로 분해되므로 실제 면역관용을 일으키는 데는 이용될 수 없으며 투여량의 극히 일부만이 면역억제항원으로 작용하므로 실제 필요량보다 훨씬 과량이 투여되어야만 한다.

<14> 종래, 펩타이드 항원을 이용한 구강면역관용의 예를 보면,

<15> Ariel Miller 등은 10일 동안 총 5회 걸쳐 MBP 펩타이드를 매회 250 μ g 씩 투여한 경우 자가면역 EAE의 증세에 효과가 있음을 확인하였는데(The Journal of Immunology, 1993, 151:7307-7315), 실제로 투여한 총량은 생쥐 한 마리 당 1.25mg으로 약 60만원에 해당하는 고가의 펩타이드 (펩트론 제작 단가 : 90% purity 16~20mer 10mg : 약500,000)를 사용하였다. 이를 사람에 적용하게 된다면 체중 비율로 따지면 (x3000) 수십억원의 치료비가 소요될 것이다.

<16> 또한, 과량의 재조합 혹은 합성 펩타이드 항원을 구강을 통해 전달하는 비용의 문제와 더불어 구강면역관용을 위해서는 자가항원을 장기간에 걸쳐 연속적으로 환자의 소화기 장관계에 노출시켜 줄 필요가 있으나 음식물 형태로 제공될 경우 소화되는 짧은 시간동안만 노출이 되므로 장기간에 걸쳐 매우 잦은 빈도로 자가항원을 투여해야 할 필요가 있다. 이는 비용의 막대한 상승과 더불어 투약의 용이성을 확보하는 것이 매우 어려움을 보여준다.

<17> MBP의 투여방법에 관해서는, MBP를 한차례 투여 (1mg) 한 것보다 여러 차례 (0.25mg x 5회) 나눠서 투여한 경우 EAE 완화 효과가 높다고 보고된 바 있으며(Cellular immunology, 1994, 157:439-447), MBP 펩타이드를 하루 한차례씩 5일간 처리한 것 보다 (500 μ g/day for 5days) 소량씩 여러 차례에 나누어 처리한 경우(100 μ g five times/day for 5days) 질병 완화에 더 효과적임이 규명된 바 있다(Journal of autoimmunity, 2003, 20:135-145.).

<18> 상기 기술한 바와 같은 연구결과를 통해, EAE 완화를 위해서는 자가항원의 지속적인 노출이 필요함을 알 수 있다. 그러나 사람의 경우 실험동물처럼 자가항원의 계속적 공급(continuous feeding)이 어렵기 때문에 위에서 언급하였듯이 투약의 용이성이 떨어지게 된다. 실험에서는 하루 5회 분할 투여 방법을 사용하였지만 이를 좀 더 세분하여 하루 10회, 혹은 20회를 처리한다면 더욱 더 효과적일 것으로 판단되지만 실험적 어려움 때문에 시도되기 힘든 문제점이 있다.

<19> 이에 본 발명자들은 상기한 바와 같은 문제점을 해결하기 위하여 연구한 결과, 미엘린 염기성 폴리펩타

이드를 분비하는 형질전환 미생물을 장내로 투여하면, 미엘린 염기성 폴리펩타이드가 형질전환 미생물에 의해 장내에서 만들어져서 지속적으로 분비되므로, 자가면역질환 치료에 효과적으로 사용될 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<20> 따라서, 본 발명의 목적은 미엘린 염기성 폴리펩타이드를 분비하는 형질전환 미생물을 함유하는 자가면역질환 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

<21> 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 미엘린 염기성 폴리펩타이드를 분비하는 형질전환 미생물을 함유하는 자가면역질환 치료용 조성물을 제공한다.

<22> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<23> 본 발명은 미엘린 염기성 폴리펩타이드를 분비하는 형질전환 미생물을 함유하는 자가면역질환 치료용 조성물을 제공한다는 점에 특징이 있다.

<24> 본 발명에서 미엘린 염기성 폴리펩타이드는 서열번호 5, 서열번호 6 및 서열번호 7로 이루어진 항원결정기를 포함한다. 바람직하게는 천연형 미엘린 염기성 폴리펩타이드의 아미노산 서열인 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 가질 수 있다. 또한, 미엘린 염기성 폴리펩타이드는 천연형 미엘린 염기성 폴리펩타이드의 아미노산 서열인 서열번호 2의 아미노산 서열 또는 이와 적어도 70% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열 중에서 선택된 적어도 50개 이상, 바람직하게는 90개 이상의 계속되는(contiguous) 아미노산으로 이루어질 수 있으며, 가장 바람직하게는 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 가질 수 있다. 본 발명의 미엘린 염기성 폴리펩타이드에는 그의 기능적 동등물도 포함된다. 본 발명에서 ‘기능적 동등물’이란 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 미엘린 염기성 폴리펩타이드와 실질적으로 동등한 생리 활성을 나타내는 폴리펩타이드를 말한다. 상기에서 ‘동등한 생리활성’이란 구강면역관용을 유도하여 자가면역질환을 일으키는 원인이 되는 T 세포를 억제하는 활성을 말한다. 상기 기능적 동등물은 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상의 서열 상동성(homology)을 갖는 폴리펩타이드일 수 있다. 상기 기능적 동등물에는, 예를 들어, 미엘린 염기성 폴리펩타이드의 아미노산 서열 내에서 아미노산의 일부 또는 전부가 치환된 변형체가 포함된다. 아미노산의 보존적 치환의 예는 다음과 같다; 지방족 아미노산(Gly, Ala, Pro), 소수성 아미노산(Ile, Leu, Val), 방향족 아미노산(Phe, Tyr, Trp), 산성 아미노산(Asp, Glu), 염기성 아미노산(His, Lys, Arg, Gln, Asn) 및 황함유 아미노산(Cys, Met). 또한 상기 기능적 동등물에는 본 발명의 미엘린 염기성 폴리펩타이드의 아미노산 서열상에서 아미노산의 일부가 결실된 변형체도 포함된다. 아울러 상기 미엘린 염기성 폴리펩타이드의 아미노산 서열의 양 말단 또는 서열 내에 몇몇의 아미노산이 부가된 변형체도 포함된다. 또한 본 발명의 기능적 동등물의 범위에는 본 발명에 따른 폴리펩타이드의 기본 골격 및 이의 생리 활성을 유지하면서 폴리펩타이드의 일부 화학 구조가 변형된 폴리펩타이드 유도체도 포함된다. 예를 들어, 본 발명의 폴리펩타이드의 안정성, 저장성, 휘발성 또는 용해도 등을 변경시키기 위한 구조변경이 이에 포함된다.

<25> 본 발명자들은 미엘린 염기성 단백질 중 MHC에 제시될 수 있는 항원결정기(epitope)를 포함하는 미엘린 염기성 폴리펩타이드(단백질의 단편)만을 발현시켰다. 이는 첫째, 전장(full-length)의 단백질을 발현시킬 경우 그 사이즈가 커지기 때문에 발현량이 감소하므로 체내에서 단백질의 지속적인 발현을 위하여 미엘린 염기성 폴리펩타이드(단백질의 단편)를 발현시켰으며, 둘째, 발현된 단백질이 단백질 고유의 생리활성을 지닌다면 이로 인한 부작용이 우려되므로, 미엘린 염기성 단백질의 항원결정기는 지니면서 단백질로서의 활성은 제거하여 오직 면역조절 T 세포 형성을 위한 항원으로만 작용되도록 디자인하였다. 상기와 같은 점을 고려하여, 본 발명의 일 실시예에서는 미엘린 염기성 폴리펩타이드(myelin basic polypeptide)의 항원결정기로 추측되는 1-10(KRPSQRHGSK, 서열번호 5), 21-40(MDHARHGFLPRHRDGTGILDS, 서열번호 6), 71-90(SLPQKSHGRTQDENPVVHFF, 서열번호 7)를 포함하는 미엘린 염기성 폴리펩타이드 단편(서열번호 4)를 분비하는 벡터를 제작하였다(실시예 2 참조).

<26> 상기 미엘린 염기성 폴리펩타이드를 분비하는 형질전환 미생물은 당업계에 공지된 유전공학적인 방법에 의해 제조할 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산서열 또는 그의 단편을 포함하는 재조합 벡터로 숙주를 형질전환함으로써 제조할 수 있다.

<27> 본 발명에서 “재조합 벡터”란 적당한 숙주세포에서 목적 폴리펩타이드를 발현할 수 있는 벡터로써,

유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 말한다.

- <28> 본 발명의 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파지 벡터 및 바이러스 벡터 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 적합한 발현벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인헨서와 같은 발현 조절 엘리먼트 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 재조합 벡터로는 유도성 프로모터, 분비서열 및 미엘린 염기성 폴리펩타이드의 유전자가 순차적으로 작동가능하게 연결되어 있는 것을 사용할 수 있다.
- <29> 본 발명에서 용어 “작동 가능하게 연결된다(operably linked)”는 것은 본 발명의 폴리뉴클레오티드가 발현 조절 서열과 결합되어 그의 기능 또는 발현이 상기 발현 조절 서열에 의해 영향을 받는 것을 말한다. 즉, 발현 조절 서열의 조절 하에 폴리뉴클레오티드의 서열이 발현되어 원하는 폴리펩티드가 형성되도록 정확한 해독 프레임을 유지시키는 것을 포함한다. 이와 같이 작동 가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드와 발현 조절 서열은 선택 마커 및 복제 개시점(replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 벡터 내에 포함될 수 있다.
- <30> 본 발명에서 용어 "프로모터"는 구조 유전자의 전사를 지시하는 뉴클레오티드 서열이다. 전형적으로, 프로모터는 구조 유전자의 전사 개시부위에 인접하는, 유전자의 5' 비-코딩 부위에 위치한다. 이들 프로모터는 예를 들어, 그러나 이에 한정되지는 않으나, IPTG-유도 프로모터, 박테리오파지 T7 프로모터 및 박테리오파지 λ pL을 포함한다(Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rded., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001). 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있으나 유도성이 바람직하다.
- <31> “유도성 프로모터”는 전사가 유도제에 의하여 조절되는 것으로, 갈락토오스(galactose), 말토오스(maltose), 아라비노오스(arabinose) 등의 탄소원에 의해서 유전자 발현을 조절하는 GAL 1 프로모터, MAL 1 프로모터, 아라비노오스 유도성 프로모터 등이 있다. 구체적으로, 본 발명자는 유도성 프로모터로 아라비노오스 유도성 프로모터를 사용하였는데, 아라비노오스에 의해서 자극될 때에만 폴리펩타이드가 분비되도록 하기 위해서이다.
- <32> 본 발명의 재조합 발현벡터에 사용될 수 있는 대장균의 분비서열로는 대장균의 열안정성 엔테로톡신 분비서열, 세포외막 단백질 A 분비서열, 베타 락타메이즈 분비서열, Gene III 분비서열, 펠비 분비서열 또는 이들의 변이체 등이 있으며, 이에 한정되는 것은 아니지만, 대장균의 Gene III 분비서열이 바람직하다.
- <33> 본 발명의 미엘린 염기성 폴리펩타이드의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터는 당업계에 공지된 방법을 사용하여 숙주 세포에 도입할 수 있다. 상기에서 세포는 효모, 식물 세포와 같은 진핵세포 또는 박테리아와 같은 원핵세포일 수 있다. 바람직하게는 박테리아이다.
- <34> 숙주세포에 따라서 폴리펩타이드의 발현량과 수식 등이 다르게 나타나므로, 목적에 가장 적합한 숙주세포를 선택하여 사용하면 된다. 숙주세포로는 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*) 또는 스태필로코쿠스(*Staphylococcus*)와 같은 원핵 숙주 세포가 있으나 이로 제한되는 것은 아니다. 또한, 진균(예를 들어, 아스페르길러스(*Aspergillus*)), 효모(예를 들어, 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세르비시애(*Saccharomyces cerevisiae*), 쉬조사카로마세스(*Schizosaccharomyces*), 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*)등과 같은 하등 진핵 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 포유동물 등을 포함하는 고등 진핵생물 유래의 세포를 숙주세포로 사용할 수 있으며, 바람직하기로는, 장내에서 생존하여 지속적으로 미엘린 염기성 폴리펩타이드를 발현할 수 있는 대장균(*Escherichia coli*)이다.
- <35> 본 발명에서는 기존의 장내 박테리아를 항생제를 사용하여 완전히 제거한 다음 미엘린 염기성 폴리펩타이드를 분비하는 대장균(*Escherichia coli*)을 마우스의 장내에 직접 전달하고, 상기 마우스의 대변으로부터 미엘린 염기성 폴리펩타이드를 분비하는 대장균을 분리하였다. 상기 결과로부터 본 발명의 미엘린 염기성 폴리펩타이드를 분비하는 대장균이 장내에서 생존하는 것을 알 수 있었다(결과 미도시).
- <36> 상기 본 발명에 따른 재조합 벡터를 숙주 세포에 도입하는 공지된 방법으로는, 이에 한정되지는 않으나, CaCl₂ 및 열 쇼크(heat shock) 방법, 입자 총 충격법(particle gun bombardment), 실리콘 탄화물 위스커(Silicon carbide whiskers), 초음파 처리(sonication), 전기천공법(electroporation) 및 PEG(Polyethyleneglycol)에 의한 침전법 등을 사용할 수 있다.
- <37> 본 발명의 일 실시예에서는 pBADgIII 벡터를 이용하여 미엘린 염기성 폴리펩타이드가 아라비노오스

(arabinose)에 의해 자극이 될 때에만 분비되는 제조합 벡터를 제작하였고, 이를 대장균에 형질전환하였다. 그 결과, 상기 형질전환 대장균이 미엘린 염기성 폴리펩타이드를 발현하는 것을 확인할 수 있었다(실시예 2 참조). 상기 폴리펩타이드는 벡터내의 분비서열(secretory signal sequence)에 의해, 대장균의 체외로 분비가 되도록 제작하였다.

<38> 상술한 방법에 의해 제조된 본 발명의 미엘린 염기성 폴리펩타이드를 분비하는 형질전환 미생물은 통상적인 배양방법에 의해 대량으로 배양할 수 있다. 배양배지로는 탄소원, 질소원, 비타민 및 미네랄로 구성된 배지를 사용할 수 있으며, 예를 들어, LB 배지(Luria-Bertani Broth)을 사용할 수 있다. 미생물의 배양은 통상의 미생물 배양 조건상에서 가능하며 예를 들어, 온도범위 15℃ 내지 45℃에서 10시간 내지 40시간 동안 배양할 수 있다. 배양액 중의 배양배지를 제거하고 농축된 균체만을 회수하기 위해 원심분리(centrifugation) 또는 여과(filtration)과정을 거칠 수 있으며 이러한 단계는 당업자가 필요에 따라 수행할 수 있다. 농축된 균체는 통상적인 방법에 따라 냉동(frozen)하거나 또는 냉동건조(lyophilized)하여 그 활성을 잃지 않도록 보존할 수 있다.

<39> 본 발명에서 “자가면역질환”은 다발성 경화증(multiple sclerosis), 자가면역성 근위축 질환, 중증 근무력증, 다발성 근육염 그 외 중추신경계 염증반응을 의미한다.

<40> 본 발명의 일 실시예에서는 상기 대장균을 실험동물의 장내로 감염시키고 동물의 음용수에 아라비노스를 희석하여 제공하여, 장내로 전달된 대장균이 미엘린 염기성 폴리펩타이드 단편을 대장균 체외, 즉 동물의 소화기 장내로 분비를 하게 하였다. 그 결과 자가면역질환 EAE가 억제되는 효과가 있음을 확인하였다(실시예 3 참조).

<41> 본 발명에서는 자가면역질환 치료효과를 테스트할 동물모델로써 실험자가면역뇌척수염(experimental autoimmune encephalomyelitis; EAE)이 유도된 마우스를 사용하였는데, 상기 실험자가면역뇌척수염(experimental autoimmune encephalomyelitis; EAE)이 유도된 마우스는 뇌와 척수의 신경세포를 둘러싼 교세포의 미엘린 피복을 인식하는 T 세포에 의해 신경세포 조직이 손상되어 정상적인 신경전달이 점차 불가능해지고 결과적으로 의식적인 몸의 조절이 힘들어지며 심한 경우 심장근육의 조절조차 불가능해져서 사망에 이르게 되는 사람의 MS (multiple sclerosis, 다발성 경화증)의 실험동물 모델이다.

<42> 본 발명의 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 투여될 수 있으며, 경구 투여시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여용의 경우, 본 발명에 따른 미엘린 염기성 폴리펩타이드를 분비하는 형질전환체는 부형제와 혼합되어 섭취형 정제, 흡수 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭시르, 서스펜션, 시럽 및 웨이퍼 등의 형태로 제형화될 수 있다. 이들 제형은 유효성분 이외에 희석제(예: 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신)와 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)를 포함할 수 있다. 상기 정제는 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리딘과 같은 결합제를 포함할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염과 같은 붕해제, 흡수제, 착색제, 향미제 및/또는 감미제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 제형은 통상적인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 의해 제조될 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 미엘린 염기성 폴리펩타이드를 분비하는 형질전환체를 장내로 전달시키기 위하여, 공지의 방법에 따라 경장적으로 코팅된(enterically-coated) 서방성 캡슐 또는 정제로 캡슐화 될 수 있다. 이는 위장을 통과한 뒤 소장내에 도달하여 활성 성분인 미생물이 신속하게 장내에 방출되도록 장용 피복시키기 위함이다.

<43> 본 발명의 조성물에 있어서, 본 발명의 미엘린 염기성 폴리펩타이드를 분비하는 형질전환 미생물의 총 유효량은 단일 투여량(single dose)으로 개체에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)이 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 미엘린 염기성 폴리펩타이드를 분비하는 형질전환 미생물은 투여 목적에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있으나, 통상적으로 1회 투여시 1x10⁶ 개 내지 1x10¹⁰ 개의 유효용량으로 하루에 수 차례 반복 투여될 수 있으며, 바람직하게는 1x10⁶ 개 내지 1x10⁷ 개이다. 그러나, 상기 형질전환 미생물은 투여 경로 및 치료 횟수뿐만 아니라 치료가 필요한 개체의 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 질환의 중증도, 식이 및 배설물 등 다양한 요인들을 고려하여 각 개체에 대한 유효 투여량이 결정되는 것이므로, 이러한 점을 고려할 때 당 분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 본 발명의 미엘린 염기성 폴리펩타이드를 분비하는 형질전환 미생물의 상기 기재된 특정한 용도에 따른 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다. 본 발명에 따른 조성물은 본 발명의 효과를 보이는 한 그 제형, 투여 경로 및 투여 방법에 특별히 제한되지 아니한다.

- <44> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.
- <45> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- <46> **<실시예 1>**
- <47> **미엘린 염기성 단백질의 항원결정기(epitope) 결정**
- <48> 미엘린 염기성 폴리펩타이드의 항원결정기를 결정하기 위하여 온라인상의 프로그램인 A DATABASE OF MHC LIGANDS AND PEPTIDE MOTIFS (Ver. 1.0) SYFPEITHI(<http://www.syfpeithi.de/>)를 이용하였다. 상기 프로그램을 이용하여 분석한 결과, 미엘린 염기성 단백질의 1-10 (KRPSQRHGSK, 서열번호 5), 21-40(MDHARHGFLPRHRDTGILDS, 서열번호 6), 71-90(SLPQKSHGRTQDENPVVHFF, 서열번호 7)이 항원결정기(epitope)로 예상되었다.
- <49> **<실시예 2>**
- <50> **미엘린 염기성 폴리펩타이드 유전자의 클로닝 및 발현벡터의 제작**
- <51> 상기 실시예 1에서 항원결정기로 예상된 1-10 (KRPSQRHGSK, 서열번호 5), 21-40(MDHARHGFLPRHRDTGILDS, 서열번호 6), 71-90(SLPQKSHGRTQDENPVVHFF, 서열번호 7)을 포함하는 미엘린 염기성 폴리펩타이드 단편을 발현하는 벡터를 제작하였다.
- <52> 먼저, 인간 미엘린 염기성 단백질 유전자(ATCC. MGC-2287)에서 DNA를 추출하여 이를 주형으로 PCR 반응을 수행하였다. 프라이머로는 *Pvu* II 및 *Xba* I 제한효소 부위를 각각 포함하도록 디자인된 서열번호 8과 서열번호 9로 표시되는 올리고뉴클레오타이드를 이용하였다. PCR 반응은 94℃에서 3분 동안 가열하여 주형 DNA를 전변성시킨 후, 94℃에서 0.5분 64℃에서 1분 및 72℃에서 1분을 1 사이클로 하여 총 30회 반복 수행하였다. 이후, 최종적으로 72℃에서 5분 동안 반응시켰다.
- <53> 상기 증폭한 437bp 크기의 DNA 단편을 제한효소 *Pvu* II 및 *Xba* I로 절단한 후, 발현벡터 pBADgIII(인비트로젠사)에 삽입하였다. 상기 벡터는 도 1에 개시된 바와 같이 아라비노스 유도성 프로모터를 가지고 있어서 아라비노스 자극에 폴리펩타이드를 만들어내는 시스템을 갖추고 있다.
- <54> 상기 제조된 재조합 발현 벡터를 ‘pDADgIII-hMBP’ 라 명명하였으며, 이후, ‘pDADgIII-hMBP’ 벡터를 Top10(genotype:F-mcrA△(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Ø 80*lacZ*△M15 △*lacX74 deoR recA1 araD139*△(*araA-leu*)7697 *galU galK rpsL endA1 nupG*)(Invitrogen사)에 CaCl₂ 및 열 쇼크 방법으로 형질전환시켰다.
- <55> **<실시예 3>**
- <56> **웨스턴 블롯에 의한 미엘린 염기성 폴리펩타이드 발현 확인**
- <57> 상기 실시예 2에서 제작한 형질전환체가 미엘린 염기성 폴리펩타이드를 발현하는지 확인하기 위하여 웨스턴 블롯을 실시하였다
- <58> 형질전환체의 배양액 농도가 0.600=0.6에서 0.2% L(+)-아라비노스를 첨가하여 미엘린 염기성 폴리펩타이드 발현을 유도하였다. 상기 배양한 박테리아에 sample buffer(12mM Tris-HCl(pH6.8), 0.4% SDS, 5% Glycerol, 144.4mM 2-mercaptoethanol, 0.02% bromophenol blue)를 넣고 가열한 뒤 원심분리한 상층액을 수득하여 SDS-PAGE를 수행하였다. 이후, 1차 항체로는 마우스 항-His 항체(mouse anti-His antibody)를 사용하였으며, 2차 항체로는 고트 항-마우스 IgG-HRP(Goat anti-mouse IgG-HRP)를 사용하여 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 웨스턴 블롯을 수행하였다. 이 때 칼모듈린(calmodulin)을 로딩 대조군으로 사용하였다.
- <59> 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이 상기 형질전환체가 인간 미엘린 염기성 폴리펩타이드(hMBP)를 발현하는 것을 확인할 수 있었다.
- <60> **<실시예 4>**
- <61> **미엘린 폴리펩타이드를 분비하는 박테리아에 의한 자가면역질환의 억제 효과**
- <62> 상기 실시예 3에서 제조한 미엘린 폴리펩타이드를 분비하는 박테리아를 오럴 인젝터(oral injector)로 장내에 직접 전달한 마우스(C57BL/6, (주)오리엔트)와 대조군으로 미엘린 폴리펩타이드를 발현하지 않는 벡터만을 가진 박테리아를 장내로 전달한 마우스(C57BL/6)에 아라비노스가 포함된 음용수를 제공한 상태에서 실험자

가면역질환인 EAE (experimental autoimmune encephalomyelitis; 이하 'EAE'라 함.)를 유도하고 0 일부터 40 일에 걸쳐 질병의 정도를 관찰하였다.

<63> <4-1> 구강면역관용 유도

<64> 먼저, 마우스에 구강면역관용을 유도하였다.

<65> 형질 전환된 박테리아 클론을 50 μ g/ml 암피실린이 포함된 LB 배지에서 키운 뒤, 1.5ml을 수거하였다. 이 때 얻어지는 박테리아는 약 10 x 10⁸/ml이었다. 수거한 박테리아를 PBS로 2번 정도 깨끗하게 씻어준 뒤에 200 μ l PBS에 잘 섞은 뒤 오럴 인젝터(oral injector)로 경구투여하여 장내에 직접 전달하였다. 경구투여는 EAE 유도를 위한 실시예<4-2>의 항원접종일을 기준으로 16일 전, 14일 전 총 두 차례 투여하였으며, 아라비노오스는 경구투여 당일부터 음용수에 타서 질병이 일어나는 시점까지 제공하였다.

<66> 대조군에는 실험군과 동일한 방법으로 실시하되 미엘린 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산서열이 삽입되지 않은 벡터만을 가진 박테리아를 투여하였다.

<67> <4-2> 동물모델에서 실험자가면역뇌척수염(experimental autoimmune encephalomyelitis; EAE)의 유도

<68> 상기 실시예 <4-1>에서 구강 면역 관용을 유도한 실험군과 대조군 마우스에 EAE를 유도하였다.

<69> MOG35-55(myelin oligodendrocyte glycoprotein 35-55, (주) 웹트론) 100 μ g과 결핵균사균(*Mycobacterium tuberculosis* H37Ra, Difco/BD Bioscience사) 300 μ g을 CFA(complete Freund adjuvant)와 1:1(v/v)로 섞어서 100 μ l를 피하주사로 넣어주었다. 그와 더불어 면역화(immunization)하는 날과 이틀째 되는 날에 백일해균 독소(*Bordetella pertussis* toxin, 시그마사) 400ng 100 μ l를 복강 주사하였다.

<70> <4-3> 임상적 병징 관찰

<71> EAE 유도 후 0일부터 약 40일 이후까지 임상학적 병징을 관찰, 측정하였는데, 임상학적 병징은 다음과 같이 기록하였다.

<72> 1점. 꼬리에 힘이 없어짐.

<73> 2점. 꼬리 완전 마비

<74> 3점. 뒷다리에 힘이 없어지고 걸음걸이가 불안정함.

<75> 4점. 뒷다리 완전 마비

<76> 5점. 앞다리 마비

<77> 임상학적 병징 관찰결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 미엘린을 발현하지 않는 박테리아를 아라비노오스(arabinose) 음용수와 함께 장내로 전달해준 대조군에서의 질병의 정도는 2.9($\pm$ 1.1)인 반면, 실험군인 미엘린 폴리펩타이드발현 박테리아를 아라비노오스 음용수와 함께 전달해준 동물에서의 질병의 정도는 1.8($\pm$ 1.7)로 질병이 개선된 것을 볼 수 있었다. 또한 질병이 발생하는 시기도 대조군(14일)에 비해 상당히 지연된 효과(17일)를 보였다

<78> <실시예 5>

<79> 미엘린 폴리펩타이드를 발현하는 박테리아에 의한 면역조절 T 세포의 형성능 조사

<80> 미엘린 폴리펩타이드발현 박테리아를 장내로 직접 전달한 실험군 마우스에서의 질병의 완화가 면역조절 T 세포의 형성에 의한 것인지를 확인하였다.

<81> MBP+ 박테리아와 MBP- 박테리아를 아라비노오스 음용수와 같이 투여한 실험동물의 비장세포에 펩타이드 항원(MBP; myelin base protein 및 MOG; myelin oligodendrocyte glycoprotein) 50 μ g/ml과 재조합 IL-2 10 unit/ml 처리하고 5일간 배양하여 시험관 내 자극(*in vitro* restimulation)후 anti-CD4-PE 항체 (BD Bioscience사)와 anti-CD25-FITC 항체 (BD Bioscience사)로 염색하고 FACS-calibur 유식세포분류기(Fluorescence Activated Cell Sorter)로 정량하였다. 각 실험군에서 CD4+CD25+ 조절성 T세포의 비율은 도 4에 나타내었다.

<82> 실험결과, EAE를 유도하는데 사용되었던 MOG 펩타이드에 대한 CD4+CD25+ 조절성 T 세포의 비율은 3.6% 대 3.7%로 대조군과 실험군에서 차이를 보이지 않았지만, 구강 면역관용을 유도하기 위해 사용하였던 MBP 펩타

이드에 대한 CD4+CD25+ 조절성 T세포의 비율은 대조군과 실험군에서 5.4% 대 6.9%로 유의한 차이를 나타내었다. 이러한 사실은 자가면역질환의 억제 효과가 조절 T 세포의 형성에 의해 이루어졌을 가능성을 보여준다.

<83> **<실시예 6>**

<84> **미엘린 폴리펩타이드를 발현하는 박테리아 투여에 의한 림프구의 IL-10 발현량 조사**

<85> 조절 T 세포의 작용에 의해 자가면역질환이 억제되는지를 확인하기 위해 세포내 염색을 통해 IL-10 사이토카인의 분비를 조사하였다.

<86> MBP 발현 박테리아와 MBP 미발현 박테리아를 장내 전달하고 아라비노오스 음용수를 제공한 동물에게 EAE 질병을 유도한 뒤 질병의 피크(peak)시기인 20일째에 동물의 장관림프절(mesenteric lymph node)을 각각 절제하여 IL-10 사이토카인에 특이적인 항체(BD Bioscience사)로 염색하고 FACS-calibur 유식세포분류기(Fluorescence Activated Cell Sorter)로 정량하였다.

<87> 그 결과 도 5에 나타난 바와 같이, MBP 발현 박테리아를 처리한 실험군에서 대조군에 비해 IL-10을 생산하는 세포의 비율이 월등히 높았다(0.8% 대 0.25%). MBP- 박테리아 처리 및 EAE 유도를 하지 않은 대조군의 경우도 마찬가지로 IL-10 발현 세포의 빈도가 매우 낮았다.

<88> 결론적으로, MBP를 발현하는 박테리아를 장내 투여한 동물에서는 MOG 면역을 통해 유도한 EAE 질병의 정도가 대조군에 비해 낮았으며, 조절 T 세포 빈도와 장관림프절의 면역억제 사이토카인인 IL-10 생산 세포의 빈도가 높게 나타났다. 따라서 본 발명의 자가항원 발현 박테리아의 장내 공급과 자가항원의 장내 발현을 통해 자가항원 특이 면역반응을 선택적으로 억제할 수 있는 조절 T 세포의 활성화가 가능하고 이를 통해 자가면역질환의 근원적 치료가 가능할 것으로 판단된다.

발명의 효과

<89> 이상 살펴본 바와 같이, 본 발명의 조성물은, 장내에서 미엘린 염기성 폴리펩타이드가 형질전환 미생물에 의해 만들어져서 분비되도록 하므로, 장내는 지속적으로 자가항원에 노출되어 면역조절세포와 자가항원이 접촉할 수 있는 기회를 극대화할 수 있는 효과가 있고, 자가항원이 장내에서 직접 만들어지므로 구강을 통한 항원 제공시 발생하는 투여항원의 위장 내 파괴와 같은 부작용을 억제할 수 있는 효과가 있으며, 구강면역관용을 유도하여 자가면역질환을 일으키는 원인이 되는 T 세포를 억제하는 효과가 뛰어나므로 자가면역질환 치료에 효과적으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 미엘린 염기성 폴리펩타이드를 분비하도록 제작된 재조합 벡터의 모식도이다.

<2> 도 2는 본 발명의 형질전환 미생물이 hMBP를 발현하는 것을 웨스턴 블롯으로 확인한 결과이다.

<3> 도 3은 MBP+ 박테리아와 MBP- 박테리아를 아라비노오스 음용수와 함께 투여한 각각의 실험군과 대조군에서의 질병의 정도를 그래프로 나타낸 것이다.

<4> MBP+ 박테리아 : 미엘린 염기성 폴리펩타이드를 분비하는 박테리아

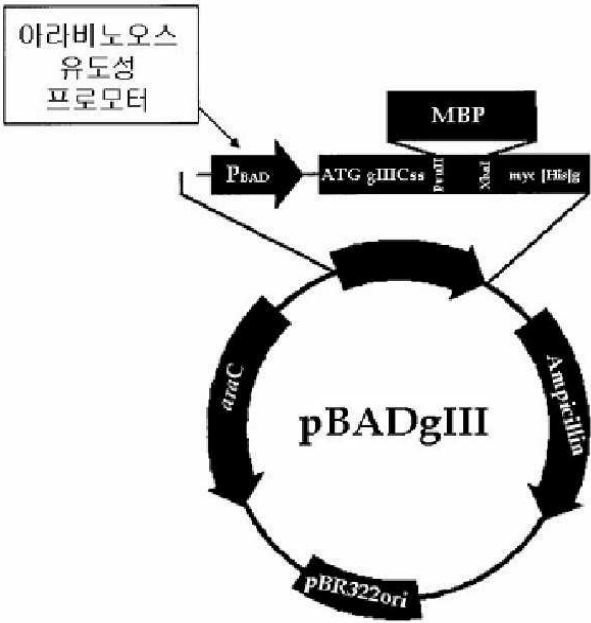
<5> MBP- 박테리아 : 미엘린 염기성 폴리펩타이드를 분비하지 않는 박테리아

<6> 도 4는 MBP+ 박테리아와 MBP- 박테리아를 아라비노오스 음용수와 함께 투여한 각각의 실험군과 대조군 마우스 비장에서 면역조절 T세포의 비율을 정량하기 위하여, 항-CD25-FITC항체와 항-CD4-PE항체로 세포 표면 염색을 한 FACS 결과이다.

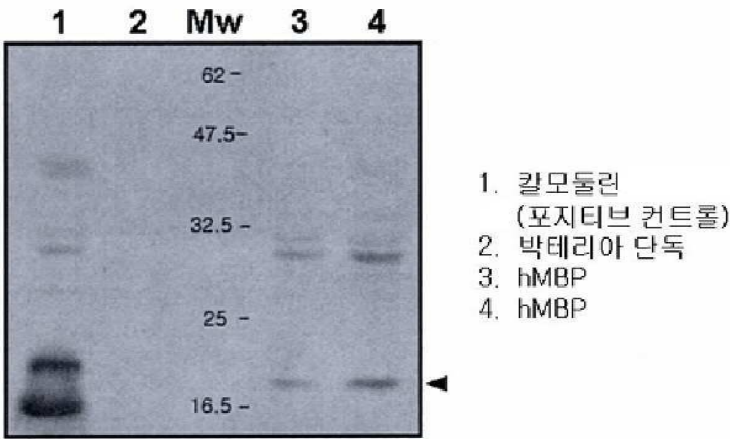
<7> 도 5는 MBP+ 박테리아와 MBP- 박테리아를 아라비노오스 음용수와 같이 투여한 실험동물의 장관림프절(mesenteric lymph node)에서의 IL-10 사이토카인의 분비를 세포내 염색을 통해 확인한 FACS 결과이다.

도면

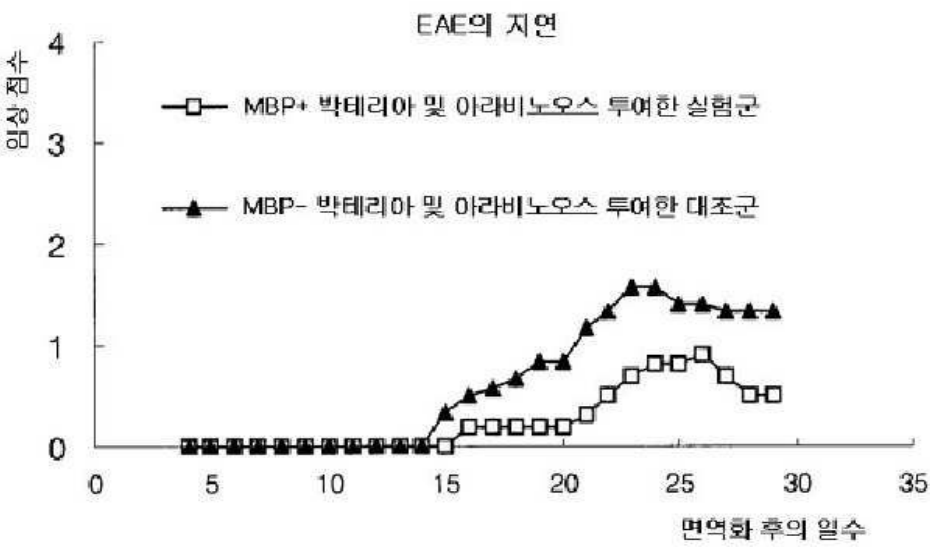
도면1



도면2

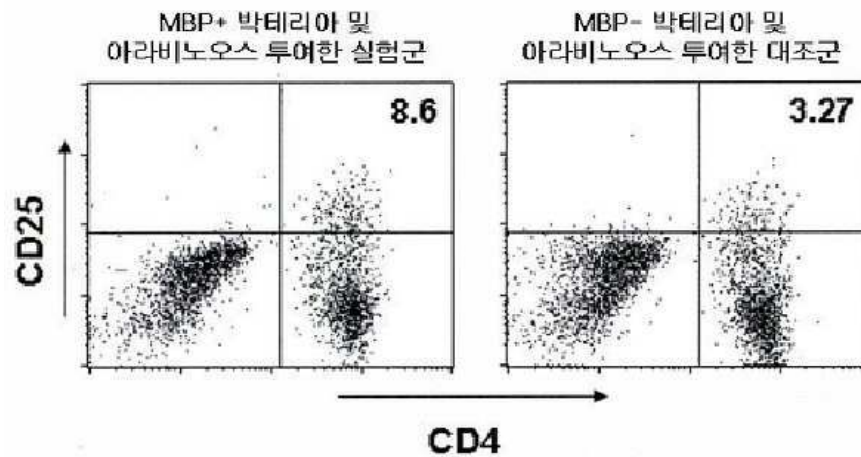


도면3



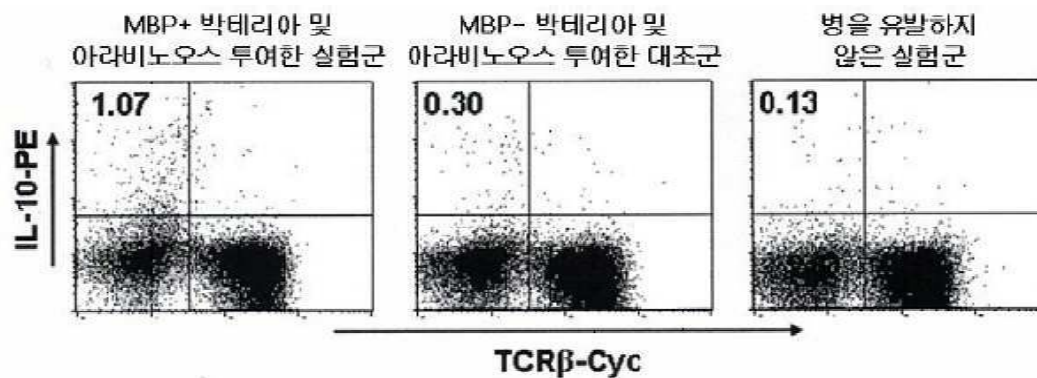
계	통	처 리 방 법	발병률	발 병 일	질병의 정도
C57BL/6		MBP+ 박테리아 및 아라비노오스 투여한 실험군	11/14	17 ± 3.9	1.8 ± 1.7
C57BL/6		MBP- 박테리아 및 아라비노오스 투여한 대조군	15/15	14 ± 3.0	2.9 ± 1.1

도면4



In vitro restimulation	MBP+ 박테리아 및 아라비노오스 투여한 실험군	MBP- 박테리아 및 아라비노오스 투여한 실험군
MBP에 의해 자극된 (restimulation) CD4+CD25+조절T 세포(%)	6.6	5.4
MOG에 의해 자극된 (restimulation) CD4+CD25+조절T 세포(%)	3.7	3.6

도면5



	MBP+ 박테리아 및 아라비노오스 투여한 실험군	MBP- 박테리아 및 아라비노오스 투여한 대조군	병을 유발하지 않은 실험군
IL-10의 % (평균)	0.8	0.39	0.13

서열 목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)