



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년03월26일

(11) 등록번호 10-1506426

(24) 등록일자 2015년03월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/08 (2006.01) A61K 47/48 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0171756

(22) 출원일자 2014년12월03일

심사청구일자 2014년12월03일

(56) 선행기술조사문헌

PLoS One. Vol. 4, No. 11, e7738, pp. 1-11 (2009)

Plos One. Vol. 4, No. 6, e6044, pp. 1-8 (2009)

전체 청구항 수 : 총 6 항

(73) 특허권자

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

황인규

경기도 고양시 일산서구 대화1로 21, 102동 1303호 (대화동, 대화마을1단지아파트)

(74) 대리인

특허법인이룸

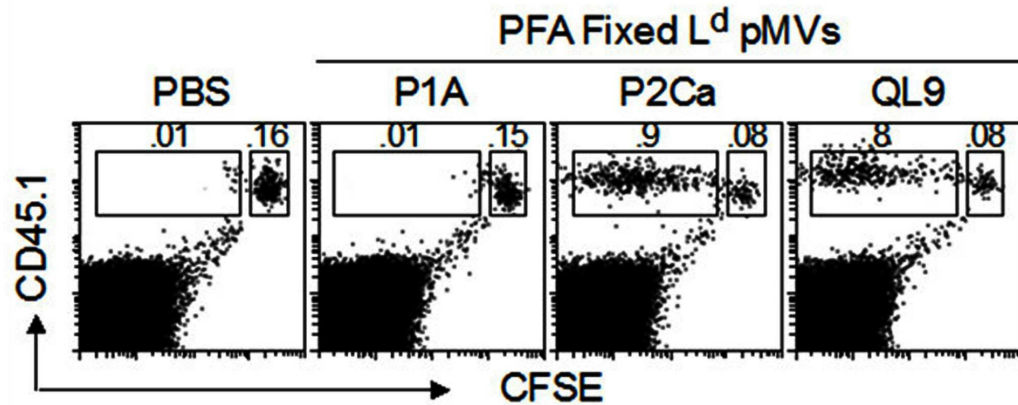
심사관 : 김은영

(54) 발명의 명칭 화학적 고정화를 통해 안정화된 미세 막상 T 세포 백신 제조방법

(57) 요약

본 발명의 곤충세포를 이용하여 MHC를 위시한 서로 다른 면역 분자들을 발현하는 인공항원발현세포를 homogenize 하고, 이때 만들어지는 세포막 유래 소포체를 분리 정제한 후, 얻어진 소포체를 파라포름알데하이드(PFA)로 처리하여 소포체에서 발현되는 MHC와 T세포 수용체(T Cell Receptor, TCR) 특이적 펩타이드를 고정화시킨 항암 백신용 조성물에 관한 것이다. 상기 고정화에 의해서, 결합강도가 낮은 MHC/peptide complex를 반영구적으로 안정화시키는 효과가 있으며, 이로 인해 소포체의 면역기능이 오래 지속될 수 있는 효과를 가져올 수 있다.

대표도 - 도6



특허청구의 범위

청구항 1

인공항원발현세포(artificial antigen-presenting cells, aAPCs)로부터 유래된 소포체(plasma membrane-derived vesicles, pMV); 및 T세포 수용체(T Cell Receptor, TCR) 특이적 펩타이드를 포함하되,

상기 펩타이드는 PFA(paraformaldehyde)에 의해 상기 소포체에 발현된 MHC(major histocompatibility complex)에 고정화되어 복합체(complex)를 이루는 것을 특징으로 하는, 항암 백신용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 인공항원발현세포는 곤충세포로부터 제조되는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 3

하기의 단계를 포함하는 항암 백신용 조성물 제조방법:

- 곤충세포에 metallothionein 유전자 promoter와 결합된 MHC의 cDNA를 도입하여 인공항원발현세포를 제조하는 단계;
- 상기 인공항원발현세포로부터 MHC가 발현된 소포체를 제조하는 단계;
- 상기 MHC에 T세포 수용체(T Cell Receptor, TCR) 특이적 펩타이드를 결합시켜, 복합체를 제조하는 단계; 및
- 상기 복합체에 파라포름알데하이드(Paraformaldehyde, PFA)를 처리하는 단계.

청구항 4

제 3항에 있어서,

상기 펩타이드는 QL9 또는 P2Ca인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 QL9은 서열번호 1로 이루어지는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 6

제 4항에 있어서,

상기 P2Ca는 서열번호 2로 이루어지는 것을 특징으로 하는, 방법.

명세서

기술분야

본 발명은 곤충세포를 이용한 인공항원발현세포(artificial antigen-presenting cells, aAPCs)의 세포막으로부터 제조한 미세막상(微細膜狀) T 세포 백신을 Paraformaldehyde로 처리하여 이들에 발현되는 항원을 안정화시키

고 이를 통해 항암백신으로서의 효능을 향상시키는 기술에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 주로 CD4+ 및 CD8+ 세포의 두 가지 주요 하위 집합으로 구성되는 T 림프구는 적응 면역에 중요한 역할을 한다. 헬퍼 T 세포로도 불리는 CD4+ T 세포는 체액성 또는 염증성 반응 중 하나를 촉진하는 사이토카인의 다양성을 형성하도록 프로그램 되어있다. 소위 세포독성 T 세포로 불리는 CD8+ T 세포는 감염 및 악성 종양을 제어하는 방법으로 병원체 (바이러스 또는 세균)에 감염된 세포 또는 종양 세포를 죽인다. 이차 림프 기관에 존재하는 T 세포의 대부분은 휴지기 상태에서 수지상 세포 (dendritic cell, DC)로 대표되는 전문 항원제공세포 (professional antigen-presenting cells, pAPC 중)에 의해 운반되어지는 동족 항원을 찾아 계속해서 림프절과 림프절(또는 비장) 사이를 옮겨 다닌다. "T 세포 수용체(TCR)"로 알려진 T 세포에서 발현되는 특이적 수용체와 pAPC 의해 운반된 동족 항원이 상호 작용하면, 무수히 많은 세포내 순차 반응이 유발된다. 그 결과, T 세포는 고유의 이펙터 기능 (예를 들어, 체액성/염증성 사이토카인 생산 또는 세포 독성 T 세포 기능)을 획득하고 복제 증식을 받도록 극적인 생리적 변화를 받는다.
- [0003] 수지상세포(dendritic cell, 이하 DC)는 말초 조직에서 항원(예- 외래 단백질, 감염성 인자)을 포획하는 능력이 뛰어나며 상기 항원들을 펩타이드 상태로 처리하고, 주요 조직 적합 유전자 복합체(major histocompatibility complex, 이하 MHC)와 함께 세포 표면에 처리된 항원을 발현시키는 제반과정을 효율적으로 수행할 수 있도록 특화된 세포이다. 이러한 과정을 통해 항원을 림프 기관으로 수송하는 역할 또한 담당하게 된다.
- [0004] TCR이 역치 이상의 친화력/결합을 가진 pMHC와 상호 작용할 때, T 세포와 DC 사이의 접촉 부분에서는 면역학적 시냅스(immunological synapse, IS)로 불리는 고도로 조직화된 구조가 형성되게 된다. 다양한 공동 자극 및 접착 분자의 채용(예를 들어, CD28 및 LFA-1와 이들의 리간드인 B7 및 ICAM-1)을 수반하는 IS의 형성은 T/APC 접촉의 전반적인 결합력을 높일 뿐만 아니라, T 세포 활성화를 위해 요구되는 신호과정을 촉진한다.
- [0005] 종양 면역학은 숙주의 면역계에 의해 체내에서 자연적으로 생성되는 암세포들이 어떻게 조절되는지를 연구하는 학문이다. 종양 면역 감시(tumor immune surveillance)의 이론은 종양 세포가 비정상적으로 이형 분자를 발현한다는 개념에 의해 더 많은 관심을 끌게 되었다, 즉, CD8+ T 세포에 의해 인지되는 종양연상항원(tumor-associated antigens, TAA)이 존재하고 이를 통해 T 세포의 활성화가 유도되며 활성화된 T 세포는 위 항원을 발현하는 암세포를 죽일 수 있게 된다는 것이다. 실제로 다수의 TAA는 꾸준히 발견되었는데, 이는 발암성 바이러스 유래 분자, 돌연변이 분자, 부자연스럽게 과잉 발현되는 분자, 암 태아성 항원 및 분자를 포함한다.
- [0006] 종양 항원은 종양세포 표면에 있는 class I 주요조직적합유전자복합체(MHC)에 의해 제시된 항원을 말하는 것으로, 종양세포에 의해서만 제시되는 종양특이항원은 일반적으로 종양의 형성과정 중에 새로이 발현된다. 일반적으로 세포독성 T세포(Tc)가 종양연상항원을 인지하면 종양세포의 증식이 일어나기 전에 종양세포를 파괴할 수 있다. 또한, 종양 면역학과 T 세포 관련 생물학의 기초 지식의 발전은 종양학 임상 분야에 큰 영향을 주고 있다. 예를 들면, TAA 유래의 펩타이드를 식별하기 위한 신속하고 민감한 방법을 개발하여 실험실에서 대량의 펩타이드 패널을 합성하고, 잠재적인 종양 백신으로 사용할 수 있다.
- [0007] 그러나, 이러한 탄탄한 이론적 근거와 다수의 유망한 전임상 연구에도 불구하고, TAA 펩타이드를 인지함으로써 종양세포의 증식을 방지하는 항암 백신의 임상 시험 결과는 기대에 미치지 못하는 수준이다. 이는 확립된 종양의 미세 환경 내에서 강력한 면역 억제 조건이 APC 기능, 면역 억제 분자의 발현, 및/또는 제어성 T 세포의 채용에 있어서 장애를 보이는 현상 등이 영향을 주는 것으로 판단된다.
- [0008] 환자의 혈액에서 높은 순도로 수지상세포를 분리하고, 그들을 in vitro에서 배양하여 임상에 사용할 수 있을 정도의 세포수를 확보하기 위한 기술의 개발은 세포 기반의 종양 백신으로서 환자 본인의 수지상 세포를 사용하는 것을 가능하게 했다. 상기와 같이 TAA 전달을 위해 환자 본인의 수지상세포를 사용하는 것은 많은 장점을 가지고 있다. 일단, 환자 자신의 세포가 항원 부하 후 다시 도입되고, 둘째로 특정한 TAA로부터 유래된 펩타이드 뿐만 아니라 온전한 TAA(또는 온전한 종양세포 추출물)가 수지상 세포 안에 도입될 수 있으며, 마지막으로 T-cell 자극을 위한 수지상세포의 효력이 배양되는 동안 조절될 수 있다는 것이 있다. 즉, 톨-유사수용체(Toll-like receptor)의 리간드나 CD40L을 위한 단클론 항체와 같은 여러 시약들로 수지상세포를 처리하는 것은 효과적인 T 세포 활성을 위한 여러 종류의 보조자극 및 접착분자의 발현에 영향을 미친다. 실제로 다수의 전임상 및 임상 시험은 항암 T 세포 면역의 유도에 있어서 DC의 효과를 입증하고 있다. 전립선 암과 흑색 종의 후기 단계를 위한 DC에 근거한 치료의 최근 승인이 장려되고 있다.
- [0009] T 세포 백신으로서의 수지상세포의 사용은 몇 가지 단점이 발견됐는데, 일단 시험관에서 배양하는 것에 시간과

비용과 시간이 소모된다는 것에 있다. 두 번째로, 살아있는 세포가 백신 접종에 사용되면, 그들의 생리적 특성이 접종 후에 변경된다는 것에 있었다. 세 번째로, 배액립프결과 같은 의도된 장기로 수지상세포를 이동시키는 직접적인 경로를 찾기가 어렵다는 것에 있다, 그리고, DC의 장기 보존은 용이하지 않다.

[0010] 한편 엑소좀은 자연스럽게 건강한 세포에서 탈락되는 나노 미터 크기의 막소포체이다. 엑소좀은 multi-vesicular body (MVB)라 불리는 세포내 소기관에서 형성되고 저장되며, 원형질막에 MVB의 차단계로서 세포의 기질로 방출된다. 엑소좀은 세포가 수지상 세포를 포함하는 세포 간 커뮤니케이션에서 역할을 하는 것으로 생각되며, 많은 다른 종류의 세포들에 의해서도 생산되는 것으로 알려져 있다. 이러한 DC 유래 엑소좀은 cell-free T 세포 백신으로 유용할 것이라는 전망이 있어왔다.

[0011] cell-free T 세포 백신으로서 수지상세포 유래 엑소좀의 유용성은 많이 알려져 있는데, Zitvogel의 연구팀은 특정 TAA를 담지한 쥐의 수지상 세포 유래 엑소좀의 투여가 같은 TTA를 발현하는 이식된 항원 세포를 제거하기 위한 항원 특정 T세포 면역 반응을 유도하는 것을 증명한 바 있다. 엑소좀 매개 면역 반응의 정확한 메커니즘은 알려져 있지 않지만, 이는 TAA 특이적 T 세포 에피토프를 담지하는 엑소좀이 내생 수지성 세포에 의해 포착되고, TAA 특이적 T 세포 에피토프가 수지상세포에 의해 교차하여 존재한다는 주장이 있다. 주목할 것은, 사람 DC의 엑소좀을 사용하여 비소 세포 폐암 치료를 위한 인간 임상 시험이 현재 진행 중에 있다는 것이다.

[0012] 온전한 수지상세포보다 DC 유래 엑소좀이 가진 주요 장점은 안정성에 있다. 엑소좀은 몇 달 동안 그 구조적 및 기능적 특성을 잃지 않고 -80 °C에서 저장될 수 있다. 이러한 장점에도 불구하고, DC 유래 엑소좀의 제조는 엑소좀의 수득 이전에 환자의 혈액으로부터 획득된 수지상세포를 실험관 밖에서 배양되어야 하기 때문에 여전히 시간과 비용이 낭비된다는 것에 있다. 또한 배양 상청액에 존재하는 엑소좀의 양은 매우 제한되어있다.

[0013] DC에서 막소포체를 얻기 위한 또 다른 방법으로 수지상 세포의 원형질 막에서 막 소포체를 제조하는 것이 시도되고 있다. 세포의 균질화 및 자당구배 초원심분리에 의한 원 세포막의 분리를 통해 DC cell line (DC2.4)에서 만들어진 원형질막으로부터 세포막 유래 소포체를 제조된 바 있다. 수지상세포의 원형질 세포막 유래 소포체의 크기가 200에서 300 나노미터의 직경을 가지고 있다는 것을 알 수 있다.

[0014] 생체 내에서 T 세포 활성화를 위한 수지상세포의 세포막으로부터 유래된 소포체(plasma membrane-derived vesicles, 이하 pMV로 약칭)의 효과는 유전자 도입된 host mice 로 이식된 2C TCR 형질전환 (Tg) T 세포와 SIYR (SIYRYGL)로 불리는 펩타이드를 활용한 시도를 통해 연구되고 있다. 상기 연구는 DC의 pMV가 SIYR 펩타이드를 담지(loaded)할 수 있다는 것을 보여주는데, 상기 pMV는 샘플 중에 남아있는 free 펩타이드와 함께 투여되었다. 상기 연구에서 흥미로운 것은, 잘 알려진 보조 자극 선천 면역인 polyIC과 비교했을 때, DC pMV의 환경에서 주입했을 때의 2C T 세포의 활성을 위한 SIYR 펩타이드의 효력이 증가한다는 것이다. 즉, 수지상세포 유래 소포체가 펩타이드 기반 cell-free T세포 백신으로 사용될 수 있는 가능성을 시사한다.

[0015] 인공적으로 제작된 APC (aAPC)는 정의된 면역분자(immunomolecules)를 발현하도록 개질된 비 면역 세포이다. MHC 클래스 I 또는 II (MHC I 또는 II) 분자를 단독으로 또는 다른 부속분자(공동 자극 및/또는 접착 분자)와 함께 발현하는 aAPC는 생체 내에서 종양세포 또는 섬유아세포 세포주와 같은 쉽게 배양될 수 있는 T 세포 활성화 세포의 다양한 측면을 연구하는데 사용된다.

[0016] 이에 더하여, 곤충 세포주 (Drosophila cell line S2, 초파리 세포주 S2)를 사용하여 aAPC 시스템이 구축된 바 있다. 상기 연구에서 MHC I (또는 MHC II), 공동 자극 분자 (예를 들어, B7-1), 및 접착 분자 (예를 들어, ICAM- 1) 등과 같은 세포, 마우스 또는 인간 면역세포를 코딩하는 유전자의 다양한 조합이 소개되었다.

[0017] S2 세포를 이용한 aAPC 시스템의 독특한 특징 중 하나는 MHC 분자가 세포 표면에 발현될 때, 담지된 펩타이드 없이 발현된다는 것이다. 곤충 세포는 MHC 안에 펩타이드를 부하시키는데 필요한 위한 항원 발현 시스템이 존재하지 않기 때문에, 곤충세포는 "naked" MHC를 세포의 표면에서 발현할 수 있다. 또한 이들 세포는 저온실온 (20-25°C)에서 배양되기 때문에 배양 중에 발현된 "naked" MHC의 변성이 거의 일어나지 않고 지속적으로 발현되게 된다. 따라서 이론적으로는 특정 펩타이드를 곤충 세포들에 담지하여 단일 종류의 pMHCs 단일 종류를 발현하는 세포를 생성 할 수 있다는 것이 보고되었다.

[0018] APC에서 탈락된 엑소좀의 T 세포 자극 활성화에 관한 연구가 진행되어 왔다. L^d mouse MHC I, B7-1 및 ICAM-1 (LdB7-1ICAM-1 Dros pMVs)을 발현하는 Dros APCs 의 상청액으로부터 얻어지는 정제된 엑소좀을 2C TCR Tg T세포와 함께 배양하면 배양된 T세포의 항원 특이적 증식을 가져온다. 즉, 2C TCR Tg T 세포의 증식은 오직 엑소좀이 발현되는 Ld가 2C TCR의 동족 펩타이드인 QL9(QLSPFPFDL)과 함께 중합체(complex)를 형성할 때만

관찰되고, 비동족 펩타이드인 P1A (LPYLGWLVF)와 함께 존재할 때는 일어나지 않는다 위 실험에서 보여지는 T 세포의 증식은 전적으로 Dros APC 유래 엑소솜에 있는 Ld/QL9에 의한 것이라는 것이 확실시되는데 그 이유는 QL9 펩타이드는 Ld와만 중합체를 형성하고 2C 세포 표면에 발현되는 Kb나 Db MHC와는 중합체를 형성하지 않는다는 것이 잘 알려져 있기 때문이다. 따라서 QL9이 중합체를 형성할 수 있는 시스템 내에 존재하는 유일한 MHC는 Ld 뿐이다.

[0019] 또한 보조자극 분자(costimulatory molecules)나 접합 분자(adhesion molecules)의 발현은 2C T 세포의 증식에 결정적인 역할을 한다는 것이 발견되었다. 따라서 wild-type 2C T세포는 anti-CD28 또는 anti-LFA-1 mAb와 함께 처리되거나, CD28의 발현이 부족한 돌연변이 2C T 세포는 QL9-loaded LdB7-1ICAM-1 Dros exosomes와 함께 배양될 때 증식의 징후가 포착되지 않는다. 수지상세포 엑소솜의 경우와 같이 배양상층액으로부터 얻어지는 Dros 엑소솜의 양은 한정되어 있다는 한계점이 있다.

[0020] P2Ca(LSPFPFDL) 펩타이드는 QL9 펩타이드와 같이 Ld와 결합하고 P2Ca/Ld 중합체는 2C TCR과 상호작용하여 T 세포의 활성화를 유도하는 성질을 가진다. 하지만 QL9과 비교하여 P2Ca의 Ld에 대한 결합 강도는 1001배 이상 낮으며 P2Ca/Ld 중합체는 QL9/Ld 중합체와 비교하여 10배 이상 낮은 강도로 2C TCR과 상호작용을 한다. 이러한 실험 결과와 합치되게 실제로 P2Ca를 이용하여 2C TCR Tg T 세포를 활성화 시킬 경우 QL9을 사용할 때와 비교하여 1,000배 정도 더 높은 농도의 펩타이드를 사용해야 한다는 것이 우리의 실험 결과로 밝혀진 바 있다. P2Ca가 Ld와 낮은 결합 강도(K_D)를 가지고 중합체를 형성한다는 사실은 이들 중합체의 안정성과도 연관이 있다. 즉 이러한 낮은 결합강도로 인해 P2Ca/Ld 중합체는 형성 후에도 쉽게 서로 분리되어 그 활성을 잃어버릴 수 있다. 이러한 낮은 안정성으로 인한 활성의 상실을 뒷받침하는 결과는 실험을 통해 얻어진 바 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0021] 본 발명은 상기와 같은 종래 기술상의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 인공항원발현세포(artificial antigen-presenting cells, aAPCs)로부터 유래된 소포체(plasma membrane-derived vesicles, pMV); 및 T세포 수용체(T Cell Receptor, TCR) 특이적 펩타이드를 포함하되, 상기 펩타이드는 PFA(paraformaldehyde)에 의해 상기 소포체에 발현된 MHC(major histocompatibility complex)에 고정화되어 복합체(complex)를 이루는 것을 특징으로 하는, 항암 백신용 조성물을 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

[0022] 또한, 본 발명은 a) 곤충세포에 metallothionein 유전자 promoter와 결합된 MHC의 cDNA를 도입하여 인공항원발현세포를 제조하는 단계; b) 상기 인공항원발현세포로부터 MHC가 발현된 소포체를 제조하는 단계; c) 상기 MHC에 T세포 수용체(T Cell Receptor, TCR) 특이적 펩타이드를 결합시켜, 복합체를 제조하는 단계; 및 d) 상기 복합체에 파라포름알데하이드(Paraformaldehyde, PFA)를 처리하는 단계를 포함하는, 항암 백신용 조성물 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0023] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0024] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 인공항원발현세포(artificial antigen-presenting cells, aAPCs)로부터 유래된 소포체(plasma membrane-derived vesicles, pMV); 및 T세포 수용체(T Cell Receptor, TCR) 특이적 펩타이드를 포함하되, 상기 펩타이드는 PFA(paraformaldehyde)에 의해 상기 소포체에 발현된 MHC(major histocompatibility complex)에 고정화되어 복합체(complex)를 이루는 것을 특징으로 하는, 항암 백신용 조성물을 제공한다.

[0025] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 인공발현세포는 곤충세포로부터 제조될 수 있다.

[0026] 본 발명은 a) 곤충세포에 metallothionein 유전자 promoter와 결합된 MHC의 cDNA를 도입하여 인공항원발현세포를 제조하는 단계; b) 상기 인공항원발현세포로부터 MHC가 발현된 소포체를 제조하는 단계; c) 상기 MHC에 T세포 수용체(T Cell Receptor, TCR) 특이적 펩타이드를 결합시켜, 복합체를 제조하는 단계; 및 d) 상기 복합체에 파라포름알데하이드(Paraformaldehyde, PFA)를 처리하는 단계를 포함하는, 항암 백신용 조성물 제조방법을 제공

한다.

[0027] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 펩타이드는 QL9 또는 P2Ca일 수 있다.

[0028] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 QL9 펩타이드는 서열번호 1로 이루어질 수 있으며, 상기 P2Ca는 서열번호 2로 이루어질 수 있다.

발명의 효과

[0029] 본 발명은 곤충세포에 MHC를 위시한 서로 다른 면역 분자들을 발현시켜 제조한 인공항원발현세포를 homogenize 하고, 이때 만들어지는 세포막 유래 소포체를 분리 정제한 후, 얻어진 소포체를 파라포름알데하이드(PFA)로 처리하여 소포체에서 발현되는 MHC와 T세포 수용체(T Cell Receptor, TCR) 특이적 펩타이드를 고정화시킨 항암 백신용 조성물에 관한 것이다. 상기 고정화에 의해서, 결합강도가 낮은 MHC/peptide complex를 반영구적으로 안정화시키는 효과가 있으며, 이로 인해 소포체의 면역기능이 오래 지속될 수 있는 효과를 가져올 수 있다. 아울러 PFA에 의한 소포체 발현 분자들의 고정화는 세포의 배양 과정이나 소포체 제조 과정에서 오염되어질 수 있는 유해 미생물(세균 또는 바이러스)을 불활성화시키는 효과도 있어 좀 더 안전한 백신의 제조에도 기여하게 된다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1은 2C Tg mouse의 lymph node에서 분수 분리한 CD8+ T 세포 (즉 2C Tg T 세포, 5×10^4)를 고정화되지 않은 2mg LdB7-1ICAM-1 Dros pMV와 함께 200 ml 세포배양 배지에서 3일간 배양시켰을 때의 결과를 나타낸 것으로서, 도 1의 (a)는 P1A 또는 QL9 펩타이드를 담지시킨 소포체로 P1A의 결과는 삼각형, 직선으로 나타내었고, QL9의 결과는 각각 10uM에서 사각형, 직선으로, 1uM에서 다이아몬드, 직선, 0.1uM에서 동그라미, 직선으로, 0.01uM에서 사각형, 점선으로 나타낸 것이다. 도 1의 (b)는 P1A 또는 P2Ca 펩타이드를 담지시킨 소포체로 p2Ca의 결과는 각각 100uM에서 사각형, 직선으로, 10uM에서 다이아몬드, 직선, 1uM에서 원형, 직선으로, 0.1uM에서 사각형, 점선으로 나타내었다.

도 2는 B6 숙주 마우스(CD45.2)에 이식(adoptive transfer)된 CFSE로 표지된 CD45.1의 대립유전자를 발현하는 2C T cell(1×10^6)가 비고정화된 LdB7-1ICAM-1 소포체에 의해 in vivo에서 활성화되는 정도를 보여주는 결과이다.

도 3은 고정화된 L^d B7-1ICAM-1 Dros pMV에 의한 2C Tg T cell의 활성화 정도를 in vitro에서 관찰한 결과이다.

도 4는 CFSE로 표지된 2C T cell(CD45.1)을 B6 숙주 마우스(CD45.2)에 T세포 이식(adoptive transfer)시킨 후 고정화된 pMV에 의한 2C T 세포의 in vivo에서의 활성화 정도를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 고정화된 L^d Dros pMV에 의한 2C Tg T cell의 in vivo 활성을 관찰한 결과이다.

도 6은 비고정화된 L^d Dros pMV에 의한 2C Tg T cell의 in vivo 활성을 관찰한 결과이다.

도 7은 L^d Dros pMV에 의해 활성화된 2C Tg T cell의 세포도살 역기능을 in vivo에서 확인한 결과로서, 2C T 세포를 (a) 이식한 쥐와 (b) 이식하지 않은 쥐에 똑같이 PFA로 고정화한 Ld/p2Ca pMV를 주사한 다음 4일 후에 SIYR 펩타이드로 담지한 B 세포(CFSE^{low})와 그렇지 않은 B 세포(CFSE^{high})를 동의 쥐에 주사하여 얻은 결과이다.

도 8은 L^d Dros pMV에 의해 활성화된 2C Tg T cell의 면역기능을 in vivo에서 확인한 결과로서, 2C T cell를 B6 쥐에 이식한 다음, P1A로 담지 되고 고정화된 Ld pMV (다이아몬드), p2Ca로 담지 되고 비고정화된 Ld pMV (동그라미), 또는 p2Ca로 담지 되고 고정화된 Ld pMV (사각형)로 각각 이식된 2C T 세포를 활성화시킨 다음 SIYR로 담지한 B 세포(CFSE^{low})와 그렇지 않은 B 세포(CFSE^{high})를 쥐에 주사하여 얻은 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 본 발명자들은 T세포의 특정항원(MHC/peptide complex)를 발현하는 소포체를 이용하여 cell-free T세포의 백신으로 이용하는 방법을 개발하고자 연구한 결과, 곤충세포를 활용하여 실험실에서 인공적으로 만든 인공항원발현 세포의 세포막으로부터 소포체를 제조하여, cell-free T세포의 백신으로 이용할 수 있다는 것을 발견하여, 본 발명을 완성하게 되었다.

- [0032] 즉, 본 발명의 목적은 인공항원발현세포(artificial antigen-presenting cells, aAPCs)로부터 유래된 소포체(plasma membrane-derived vesicles, pMV); 및 T세포 수용체(T Cell Receptor, TCR) 특이적 펩타이드를 포함하되, 상기 펩타이드는 PFA(paraformaldehyde)에 의해 상기 소포체에 발현된 MHC(major histocompatibility complex)에 고정화되어 복합체(complex)를 이루는 것을 특징으로 하는, 항암 백신용 조성물을 제공하는 것에 있다.
- [0033] 본 발명에서 사용되는 용어, "인공항원발현세포(artificial antigen-presenting cells, aAPCs)"는 면역계 활성화를 위하여 제조된, 인공항원을 발현하는 세포로서, 본 발명의 목적상, 면역분자들의 cDNA를 초파리의 metallothionein 유전자 promoter와 결합하여 S2세포에 주입된 세포를 의미하나, 이로써 제한되는 것은 아니다.
- [0034] 또한, 상기 인공항원발현세포는 곤충의 세포주로부터 유래한 것을 특징으로 한다. 본 발명의 실시예에서, 상기 세포주는 초파리 세포주(Drosophila cell line S2)를 이용하였으나, 상기 세포주에 제한되는 것은 아니다.
- [0035] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 펩타이드는 2C T세포 수용체(T cell receptor, TCR)를 통한 T 세포 활성화를 유도하는 펩타이드인 것으로, 상기 펩타이드가 소포체에 발현되는 MHC에 담지되어 TCR에 특이적으로 상호작용함으로써, T세포를 활성화 시킬 수 있는 효과를 가지고, 이로 인해 T세포 백신으로서 사용될 수 있는 것이다.
- [0036] 상기 펩타이드는 QL9 또는 P2Ca일 수 있으나, MHC에 특이적으로 결합하여 특정 TCR을 통한 T 세포의 활성화를 유도할 수 있는 펩타이드라면 이에 제한되지 않는다. 상기 펩타이드는 쥐의 1형 MHC의 일종인 Ld에 결합되어 그 활성을 보인다.
- [0037] 상기 QL9는 서열번호 1(QLSPFPFDL)로 이루어지고, 상기 P2Ca는 서열번호 2(LSPFPFDL)로 이루어진다.
- [0038] 소포체를 이용한 T세포 백신은, 소포체에 발현되는 단백질들(예: 보조자극분자, 접합분자, 세포막 사이토카인)의 조합을 여러 가지로 달리할 수 있고 발현되는 분자들의 밀도를 인위적으로 증가시켜 면역 효능을 증진시킬 수 있다는 점에서 단순히 펩타이드를 이용한 백신보다 현저히 우수한 효과를 가진다.
- [0039] 종래 기술에 의하면, in vitro에서 제조된 라이포솜과 순수하게 분리정제된 유전자 재조합 단백질 등을 이용하여 cell-free T세포의 백신을 제조하였으나, 본 발명에서는 인공항원발현 세포의 세포막 유래 소포체를 이용하였다. 보다 구체적으로, 상기 소포체의 나노크기의 막상 구조(미세 막상)에 발현된 MHC와 T세포 수용체(T Cell Receptor, TCR)에 특이적 펩타이드를 결합시킨 cell-free T세포의 백신을 제조하였으며, 이로써, 종래기술과 비교하여 제조 경비를 줄일 수 있고, 소포체 생성 또는 제조와 관련된 기술적인 문제들을 최소화 할 수 있는 장점을 가진다.
- [0040] 따라서, 본 발명의 목적은 a) 곤충세포에 metallothionein 유전자 promoter와 결합된 MHC의 cDNA를 도입하여 인공항원발현세포를 제조하는 단계; b) 상기 인공항원발현세포로부터 MHC가 발현된 소포체를 제조하는 단계; c) 상기 MHC에 T세포 수용체(T Cell Receptor, TCR) 특이적 펩타이드를 결합시켜, 복합체를 제조하는 단계; 및 d) 상기 복합체에 파라포름알데하이드(Paraformaldehyde, PFA)를 처리하는 단계를 포함하는, 항암 백신용 조성물 제조방법을 제공하는 것에 있다.
- [0041] 본 발명의 제조방법은 파라포름알데하이드(paraformaldehyde, PFA)에 의해서 고정화되는 것을 특징으로 한다. 상기 고정화로 인해 소포체에 발현되는 면역 분자들의 구조와 생물학적 활성이 반영구적으로 보존될 수 있다. 이러한 구조의 안정화는 소포체의 면역 기능을 in vivo에서 유지시키는데 있어 매우 중요하다.
- [0042] PFA를 이용한 MHC/peptide complex의 고정화는 peptide가 MHC에서 분리되어 T세포 자극 활성을 잃어버리는 것을 막아주는 효과를 가진다. 이러한 효과는 MHC와 peptide의 결합강도가 낮은 경우에 MHC/peptide의 활성을 오래 유지시키는 것에 있어 매우 중요하다.
- [0043] PFA를 이용한 소포체의 고정화는 곤충세포 또는 배양액에 혹시 존재할지도 모르는 유해 병원균을 불활성화 시키는 작용을 하여, 소포체 백신의 in vivo 사용시 안정성에 기여할 수 있다.
- [0044] PFA를 통한 소포체의 안정화는 실시예 5를 통해서 확인할 수 있는데, 고정화되지 않은 경우 T세포의 활성화에 낮은 효과를 보이던 P2Ca가 고정화된 경우 현저히 증가된 활성화를 보였다는 것을 확인하였다.

[0045] 따라서, 본 발명은 인공항원발현세포(artificial antigen-presenting cells, aAPCs)로부터 유래된 소포체(plasma membrane-derived vesicles, pMV); 및 T세포 수용체(T Cell Receptor, TCR) 특이적 펩타이드를 포함하되, 상기 펩타이드는 PFA(paraformaldehyde)에 의해 상기 소포체에 발현된 MHC(major histocompatibility complex)에 고정화되어 복합체(complex)를 이루는 것을 특징으로 하는, 항암 백신용 조성물을 투여하여, 암을 치료하는 방법을 제공할 수 있다.

[0046] 또한, 본 발명은 인공항원발현세포(artificial antigen-presenting cells, aAPCs)로부터 유래된 소포체(plasma membrane-derived vesicles, pMV); 및 T세포 수용체(T Cell Receptor, TCR) 특이적 펩타이드를 포함하되, 상기 펩타이드는 PFA(paraformaldehyde)에 의해 상기 소포체에 발현된 MHC(major histocompatibility complex)에 고정화되어 복합체(complex)를 이루는 것을 특징으로 하는, 항암 백신용 조성물의 암 치료 용도를 제공할 수 있다.

[0047] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0048] **[실시예]**

[0049] **실시예 1. 곤충세포를 이용한 인공항원발현세포의 세포막으로부터 유래된 소포체(pMV)의 제조**

[0050] 우선, S2 세포를 이용하여 인공항원발현세포의 제조하였으며, 이를 위해 쥐 또는 사람의 면역분자들의 cDNA를 초파리의 metallothionein 유전자 promoter와 결합하여 S2 세포에 주입하였다. 이 때 DNA가 주입된 세포들의 안정한 발현과 유지를 위하여 항생제 내성에 관여하는 유전자를 함께 도입하였으며, 이때 사용한 유전자는 G418이라는 항생제에 대하여 내성을 나타내게 하는 유전자를 이용하였다. S2 세포에 주입한 면역분자들의 발현이 metallothionein 유전자에 의해 조절되며, 이를 위하여 소량의 Cu^{2+} 이온을 필요로 한다. 따라서, 이를 위하여 소포체 제조 하루 전에 S2 세포의 배양액에 $CuSO_4$ 를 100mM로 첨가하고 24 시간 배양함으로써, 면역분자들의 발현된 인공항원발현세포를 제조하였다.

[0051] 본 발명자들은 목적하는 마우스 면역분자를 발현하는 Dros APC 유도 세포막 유래 소포체의 수율을 증가시키기 위해서, 초파리의 원형질 세포막으로부터 분획법을 사용하여 세포막유래 소포체를 제조하였다 소포체의 제조 방법을 좀 더 자세히 설명하면 다음과 같다. 일단 면역분자들을 발현하는 Dros APC(1×10^9)를 배양한 다음 이들 세포들을 모아 소량(50 ml)의 hypotonic buffer(15 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 10 mM Hepes, pH 7.5)에 재분산시킨 후, 이들 세포의 세포막을 Contes homogenizer를 이용하여 분쇄하여 소포체 형태로 만들었다. 만들어진 조세포액(crude extract)에 존재하는 소포체를 고속 원심분리기를 이용하여 회수한 다음, isotonic buffer(40 mM Tris-Cl, 10 mM KCl, 10 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, pH 7.2)를 이용하여 재분산시켰으며, 이렇게 만들어진 소포체 용액에는 소포체 이외에도 여러 가지 다른 macromolecules과 세포 organelle들이 포함되어 있을 뿐만 아니라 endoplasmic reticulum에서 유래된 막상 소포체들도 포함되어 있다. 이러한 소포체 용액으로부터 세포막 유래 막상 구조물만을 순수 분리하기 위하여 sucrose gradient ultracentrifugation을 실시하였다. 이때 사용한 sucrose의 농도는 20, 35, 40 및 50% 이며 원심분리는 20,000g에서 2 시간 동안 수행한다. 세포막 유래 소포체는 원심분리 후 20%와 35% sucrose의 경계에서 회수하였으며, 이렇게 얻어진 pMV는 -70℃에서 보관하였다.

[0052] 본 발명의 방법으로 소포체를 제조한 결과, 같은 양의 배양액에서 얻어낸 엑소좀이 발현하는 면역세포의 양보다, 약 20배 이상의 마우스 면역세포를 발현하는 Dros 세포막 유래 소포체를 제조하였으며, 상기 소포체는 150 내지 400 nm의 직경을 가지고 있음을 확인하였다.

[0053] **실시예 2. Dros pMV의 T 세포 자극 활성 확인(in vitro)**

[0054] 본 실시예에서는, Dros pMV의 in vitro T 세포 자극 활성을 조사하기 위하여, pMV에 QL9 및 p2Ca를 담지시켜 T 세포의 자극 활성을 확인하였다.

[0055] pMV에 QL9(서열번호 1, QLSPFPFDL) 및 p2Ca (서열번호 2, LSPFPFDL) 두 종류의 펩타이드를 담지시켰다. 실험에

사용되는 T세포로는 고도로 정제된 2C Tg T 세포를 사용하였으며, 세포의 활성화 정도는 상기 세포들의 세포분열 과정에서 필수적으로 일어나는 DNA의 합성 정도를 측정하였다. 이를 위해 세포배양 종료 전 8시간 동안 [3H]-labeled thymidine으로 상기 세포들을 처리하고 세포내 DNA에 thymidine과 함께 들어간 [3H]의 방사선 양을 측정하는 방법으로 수행하였다.

[0056] QL9 및 p2Ca 펩타이드는 Ld MHC I 및 pMHC 복합체(Ld/QL9, Ld/p2Ca)를 형성하며, 상기 복합체는 모두 2C TCR로 인식된다. 다만, QL9 및 p2Ca 펩타이드의 L^d 결합 친화력은 차이가 있으며, Sykulev의 연구에 의하면 (Sykulev Y, Brunmark A, Tsomides TJ, Kageyama S, Jackson M, et al. (1994) High-affinity reactions between antigen-specific T-cell receptors and peptides associated with allogeneic and syngeneic major histocompatibility complex class I proteins. Proc Natl Acad Sci U S A 91: 11487-11491), QL9 및 p2Ca 펩타이드의 L^d 에 대한 결합 친화력은 각각 2×10^{-8} 과 4×10^{-6} 이다. 2C TCR에 대한 L^d /QL9 친화력 및 L^d /p2Ca 복합체의 결합도 역시 각각 2×10^{-7} 과 2×10^{-6} M으로 다르며, 이러한 차이를 반영하여 2C T 세포의 실험관 활성을 위해 p2Ca 펩타이드의 농도는 약 1000 fold 이상으로 판단하였다.

[0057] 도 1에 나타낸 바와 같이, 정제된 2C T 세포는 p2Ca 또는 QL9 peptide가 담지된 LdB7-1ICAM-1 Dros pMV와 함께 배양될 때 강력한 증식을 보여 주었다. P1A 펩타이드로 처리된 LdB7-1ICAM-1 pMV와 2C T 세포를 배양하였을 때에는 전혀 T 세포의 증식이 일어나지 않았다. 2C T 세포의 활성화에 필요한 p2Ca 펩타이드의 농도는 QL9의 농도보다 약 500배 정도 크다는 것을 확인하였다. (참고로, P1A 펩타이드는 Ld 1형 MHC와는 매우 높은 강도로 결합하여 복합체를 형성하지만 Ld/P1A 복합체는 2C TCR과는 전혀 반응하지 않는다는 것이 잘 알려져 있다.)

[0058] 종래 기술에서 Dros exosomes로부터 수득된 결과에 부합되게, B7-1의 수용체인 CD28이나 ICAM-1의 수용체인 LFA-1에 특이적인 항체를 이용한 실험을 통해 QL9가 담지된 pMV 또는 p2Ca가 담지된 pMV에 의한 2C T 세포의 활성 및 증식에 CD28/B7-1 및 LFA-1/ICAM-1의 상호작용이 필수적임을 중요하다는 것을 확인하였다.

[0059] 실시예 3. Dros pMV의 T 세포 자극 활성 확인 (in vivo)

[0060] 컨제닉(congenic) 숙주 마우스(B6)에 도입한 2C TCR Tg T 세포를 사용하여 in vivo T세포 자극 하에서 Dros pMV의 효과를 측정하였다. 본 실시예에서는 CD45.1 및 CD45.2 대립 유전자의 발현을 제외하고는 같은 유전형질을 공유하고 있는 2C Tg와 B6 mice를 사용하였다.

[0061] 간단히, 정제된 2C T세포를 CFSE(carboxyfluorescein succinimidyl ester)로 표지하였고, 상기 세포를 B6 마우스의 정맥에 주사하였다. 2C T세포를 도입하고 하루 후, 펩타이드가 담지된 Dros pMV를 정맥주사하였다. pMV의 주사 3~4일 후 림프절 및 비장을 각각의 단일세포 현탁액의 제조를 위해 획득했다. 상기 세포들을 CD8+ 및 CD45.1로 염색했고(도 1B), 2C T세포 안의 CFSE 희석 양을 측정하기 위해 유세포분석기들을 통해서 측정하였다.

[0062] 도 2에 나타낸 바와 같이, CFSE 세기의 감소에 의해 보여지는 2C T세포(CD45.1⁺ 세포)의 세포분열에 의한 증식은 오직 QL9이 담지된 pMV가 투여된 경우에서만 발견되고 P1A나 p2Ca로 담지된 pMV가 투여된 경우에는 전혀 세포분열이 일어나지 않는 것을 볼 수 있음을 확인하였다.

[0063] 상기 결과를 통해 QL9-loaded pMV에 의한 2C T세포의 증식은 특별히 L^d /QL9 복합체에 의한 것임을 의미한다.

[0064] 실시예 4. pMV에 담지된 펩타이드의 고정화 처리

[0065] 본 발명자들은 세포 분열에 따라 pMV에 담지된 펩타이드가 체내에서 소실되는 현상을 방지하기 위해서, pMV에 펩타이드를 담지시킨 후, 파라포름알데하이드(paraformaldehyde, 이하 PFA) 용액으로 처리하여 펩타이드를 고정화 시켰다.

[0066] 단량체 PFA는 펩타이드 본드에서 염기성 아미노산(lysine)안의 일차 아민과 이차아민에 의해 발생하는 상호 또

는 내부 분자의 가교 결합을 매개할 수 있으므로 고정화에 이용될 수 있다.

[0067] 따라서, 펩타이드가 담지된 Dros pMV를 PFA 용액을 처리하여 고정화 시켰다(at room temperature). 고정화된 pMV는 그 후 3번의 완충액 변경과 함께 이를 동안 dialysis bag을 이용해 투석하였으며, 이 후, 고정화된 pMV의 양은 시료의 단백질 농도에 기초하여 측정하였다.

[0068] **실시예 5. PFA 고정화 처리에 따른 pMV의 T세포 자극 활성 확인**

[0069] 본 실시예에서는, 우선, PFA 고정에 의해 유지된 pMV에서 발현되는 면역분자의 기능 향상여부를 확인하였다. p2Ca 또는 QL9 펩타이드가 담지되고, 0.5%의 PFA 용액에 의해 처리된 L^dB7-1ICAM-1 Dros pMV를 2C T세포와 함께 배양시킬 때, 2C T세포의 활성화를 통한 세포분열 정도를 관찰하였다.

[0070] 도 3에 나타난 바와 같이, QL9으로 담지할 경우에는 고정화의 유무가 실험 결과에 큰 영향을 미치지 않는 것을 알 수 있다. 하지만, P2Ca의 경우에는 고정화된 pMV를 사용할 경우 비교적 낮은 농도에서도 2C T 세포를 활성화 시킬 수 있다. 이러한 실험 결과는 PFA에 의한 고정화가 1형 MHC와 펩타이드의 중합체의 면역활성을 소멸 시키지 않을 뿐만 아니라 오히려 증진시키는 결과를 초래한다는 것을 의미한다.

[0071] 아울러, in vivo에서 PFA로 고정화된 pMV의 효과를 확인하였으며, 이를 위하여 Dros pMV를 0.5% PFA 용액으로 고정화시켰다.

[0072] 도 4에 나타난 바와 같이, P1A 펩타이드를 담지한 LdB7-1ICAM-1 pMV를 사용 경우, PFA 용액으로 처리된 고정화 여부와 관계없이 T세포가 활성화 및 증식이 관찰되지 않은 반면, p2CaP1A 펩타이드를 담지한LdB7-1ICAM-1 pMV를 사용 경우, 고정화에 의하여 현격히 증가된 T세포 활성을 확인하였으며, 이를 통해 고정화된 pMV에 의한 T세포의 활성화/증식의 항원-특이성이 확인되었다.

[0073] 또한, 고정화 처리하지 않은 pMV에서 얻은 결과와 마찬가지로 고정화된 QL9-담지 LdB7-1ICAM-1 pMV의 투여는 B6 mice에 이식된 2C QL9-담지 LdB7-1ICAM-1 pMV에 의한 T세포의 증식을 현저히 증가시켰으며, 특히, 본 실시예에서는 고정화 처리하지 않은 pMV에서 얻은 결과와 달리 QL9-담지 LdB7-1ICAM-1 pMV뿐만 아니라, p2Ca담지 고정화 pMV의 투여에서도 T세포의 강력한 증식을 유도하였다.

[0074] 상기결과는 고정화 처리를 하지 않은 p2Ca 담지 pMV에서 T세포 증식이 매우 적었다는 점을 고려해 볼 때, PFA 고정화는 MHC와 펩타이드 사이의 결합 친화력이 낮은 경우, 펩타이드와 함께 담지된 Dros pMV의 T세포-자극 활성을 증가시킬 수 있다는 것을 보여준다.

[0075] **실시예 6. PFA 고정화된 pMV에서의 보조자극 분자 및 접착분자 발현의 확인**

[0076] 본 실시예에서는 고정화된 pMV 안에 존재하는 보조자극분자(B7-1) 및 접착분자(ICAM-1)의 발현이 2C T 세포의 in vivo 활성화에 필수적인 것인지를 확인하였다. 이때, B7-1 및 ICAM-1가 발현되지 않고, L^d만을 발현하는 Dros pMV를 사용하여, 공동자극분자 및 접착분자의 필수성을 확인하였다.

[0077] L^dB7-1ICAM-1 pMV와 같이, p2Ca 또는 QL9를 담지한 고정화된 L^d pMV 를 첨가하고, 0.5% PFA로 처리하였다.

[0078] 위에서 설명한 대로 in vitro에서 Dros pMV에 의해 정제된 2C Tg T 세포의 활성화와 그에 따른 세포 증식을 위해서는, 고정화와 비고정화에 상관없이, B7-1 및 ICAM-1의 발현이 결정적인 역할을 한다. 따라서 B7-1 과 ICAM-1이 발현되지 않는 L^d pMV는 고정화 여부에 상관 없이 정제된 2C Tg T 세포를 in vitro에서 활성화 시키지 못하며, 이러한 결과는 본 실험을 통해서도 확인하였다.

[0079] 이러한 in vitro 결과와는 대조적으로 도 5와 6에서 나타난 바와 같이 in vivo에서는 고정화된 L^d pMV에 의한 2C T세포의 강력한 증식을 확인하였다. 이러한 세포 증식은 QL9 펩타이드로 담지할 경우는 고정화의 유무에 상관 없이 관찰 되었으나 p2Ca 펩타이드로 담지할 경우는 고정화된 경우에만 관찰되었다. 이러한 결과는 L^dB7-1ICAM-1 pMV를 이용하여 얻은 결과 고정화의 효과를 다시 한번 입증한다 할 수 있다. 아울러 상기 결과는 in vitro에서의 pMV에 의한 세포 활성화와 달리 in vivo에서의 pMV에 의한 세포 활성화를 위해서는 pMV에 보조자극 분자(B7-1)나 접합분자(ICAM-1)이 직접 발현되지 않아도 됨을 보여준다.

[0080] **실시예 7. 본 발명의 pMV의 활성화 기능 확인**

[0081] 본 실시예에서는 in vivo에서 Dros pMV가 투여된 2C T세포에서의 세포독성 T세포의 활성화를 측정하였다.

[0082] 우선, 정제된 2C T세포를 실시예 5, 6에서와 같이 숙주 마우스(B6 mice)에 전이시켰으며, 2C T세포의 전이 하루 후, p2Ca를 담지한 PFA 고정화된 L^d pMV와 p2Ca를 담지한 PFA 고정화되지 않은 L^d pMV를 각각 숙주 마우스에 투여하였다. pMV의 투여 3일 후, 독성 2C T세포의 타겟 세포가 대조군 세포와 함께 정맥 주사되었다. 투여 18시간 후, 단일 세포 현탁액의 제조를 위해 숙주 마우스로부터 비장을 적출하였고, 현탁액에서 대조 세포에 대한 타겟 세포의 비율을 유세포 분석기를 이용하여 관찰하여 분석하였다.

[0083] 독성 2C T 세포에 의해 대조군 세포들이 사멸할 때, 타겟 세포들의 비율은 현저하게 감소할 것으로 기대되었다. 타겟세포 및 대조군 세포들은 하기에 기술되는 방법으로 제조되었다. B6 마우스의 비장세포들은 2개의 군으로 나누었고, 각각 $5\mu\text{M}$ 및 $0.5\mu\text{M}$ 의 CFSE 용액으로 표지되었다.

[0084] 도 7의 (a)에 나타난 바와 같이, 2C T 세포를 이식하지 않은 쥐에서 얻은 결과의 전형적인 예로 고정화된 $Ld/p2Ca$ 의 주사 후에 이들 소포체에 의해 활성화되는 2C T 세포가 없었으며, 활성화된 2C T 세포의 타겟인 SIYR로 담지된 B 세포를 죽이지 못해 SIYR로 담지된 세포의 수와 SIYR로 담지하지 않은 세포의 수가 동일하게 유지되고 있음을 확인한 반면, 도 7의 (b)에 나타난 바와 같이, 2C T 세포를 이식한 쥐에 PFA로 고정화한 $Ld/p2Ca$ 소포체를 주사한 다음 SIYR로 담지한 B 세포를 주사할 경우 이들 세포의 수가 급격히 감소하는 것이 관찰되었다. 이는 PFA 처리한 $Ld/p2Ca$ 소포체에 의해 활성화된 2C T 세포가 SIYR이 담지된 B 세포를 인식하고 이들 세포를 죽였음을 의미하며, SIYR로 담지하지 않은 B 세포들은 그 수가 전혀 줄지 않는 것으로 미루어 이러한 면역 반응은 SIYR 펩타이드 특이적으로 발생된다는 것을 알 수 있다.

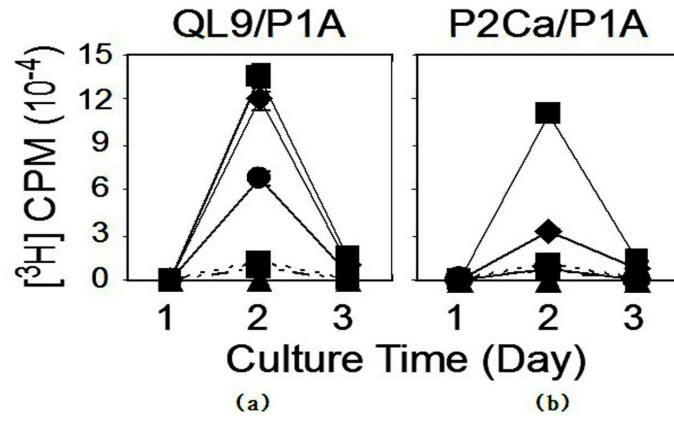
[0085] 또한, 도 8에 나타난 바와 같이, p2Ca를 담지한 PFA 고정화된 L^d pMV가 투여될 때, P1A 담지 고정화 pMVs 또는 p2Ca가 담지 되고 비고정화 상태의 Ld pMV (natural pMV loaded with p2Ca peptide)가 투여될때와 비교하여, $CFSE^{high}$ cell에 대한 $CFSE^{low}$ cell의 비율이 눈에 띄게 줄어든다는 점을 확인하였으며, 비율의 감소의 정도는 숙주 마우스로 이식된 2C T세포의 양이 증가함에 따라 점점 더 커짐을 확인하였다.

[0086] 이러한 결과를 볼 때, p2Ca 담지 고정화 L^d Dros pMV의 투여는 증식을 유도할 뿐만 아니라, in vivo 2C T cell의 활성화 기능의 발달을 유도한다는 것을 확인하였다.

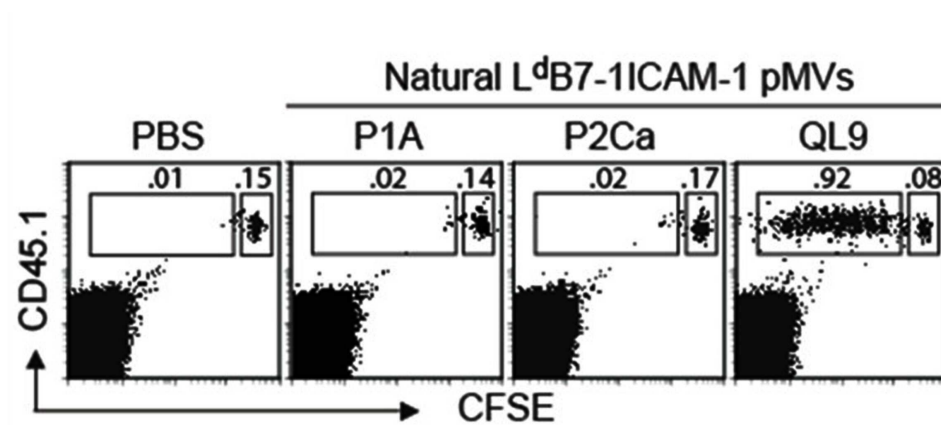
[0087] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예 및 실험예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야 한다.

도면

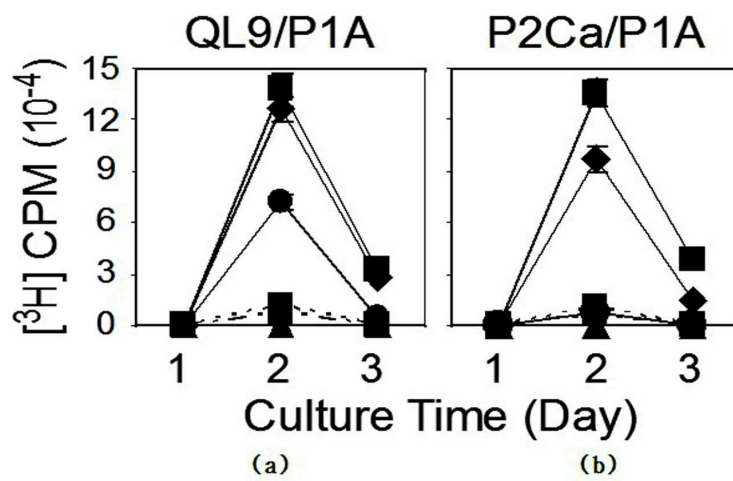
도면1



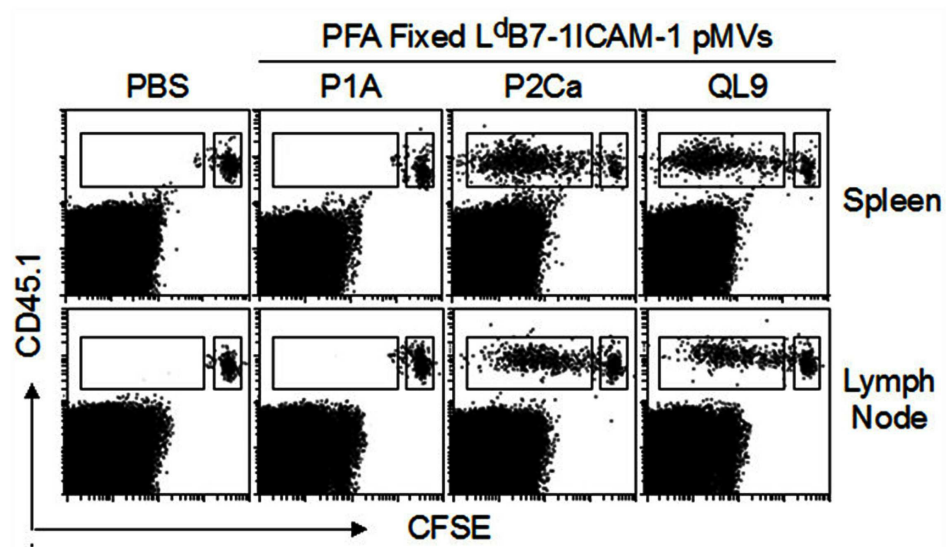
도면2



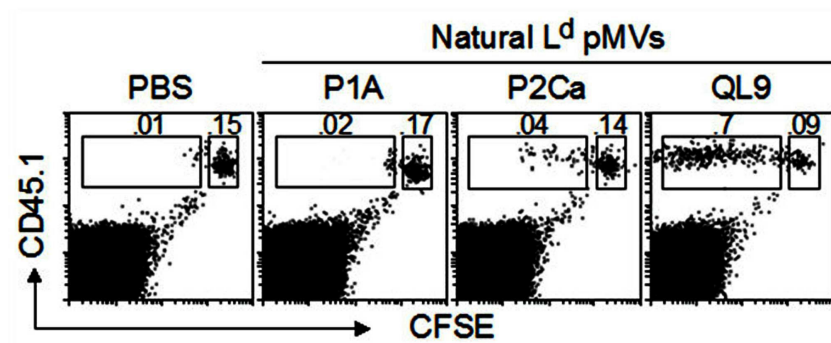
도면3



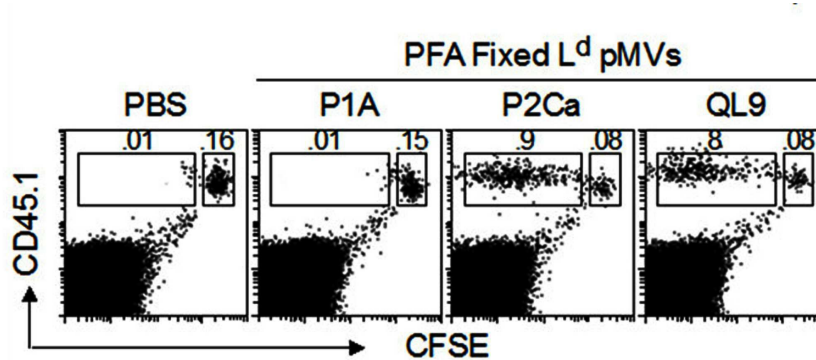
도면4



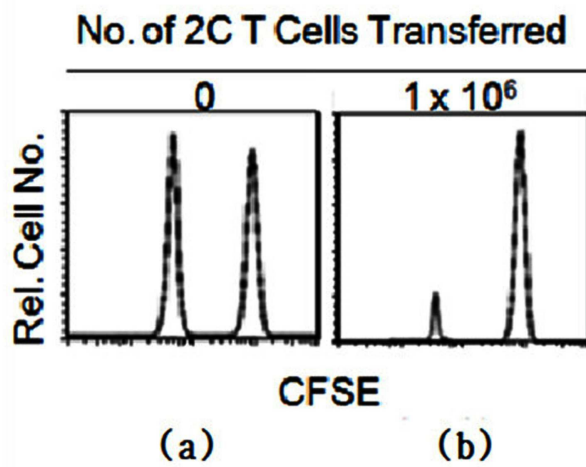
도면5



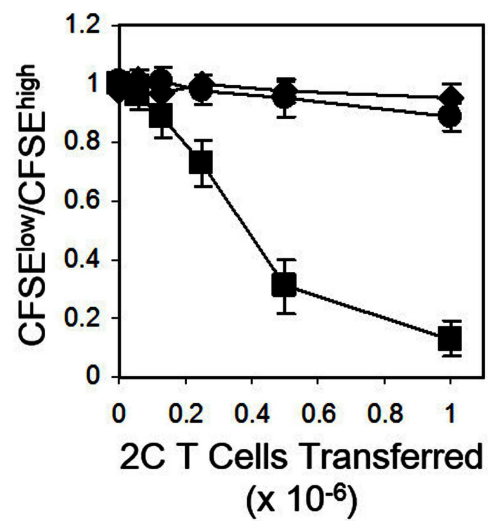
도면6



도면7



도면8



서열목록

- <110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
- <120> Method for Preparing nanometric vesicular T cell vaccine
stabilized and potentiated by chemical fixation with
paraformaldehyde.
- <130> PB14-12200
- <160> 3
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> QL9

<400> 1

Gln Leu Ser Pro Phe Pro Phe Asp Leu

1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> P2Ca

<400> 2

Leu Ser Pro Phe Pro Phe Asp Leu

1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> P1A

<400> 3

Leu Pro Tyr Leu Gly Trp Leu Val Phe

1 5