



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0049896  
(43) 공개일자 2018년05월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 39/39 (2006.01) A61K 36/03 (2006.01)  
A61K 39/00 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
A61K 39/39 (2013.01)  
A61K 36/03 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2016-0146373  
(22) 출원일자 2016년11월04일  
심사청구일자 2016년11월04일

(71) 출원인  
부경대학교 산학협력단  
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동,  
부경대학교)  
(72) 발명자  
오정환  
부산광역시 남구 분포로 111, 106동 1006호(LG 메  
트로시티)  
곽민석  
부산광역시 남구 분포로 113, 228동 104호(LG 메  
트로시티)  
진준오  
부산광역시 남구 분포로 111, 139동 202호(LG메트  
로시티)  
(74) 대리인  
위병갑

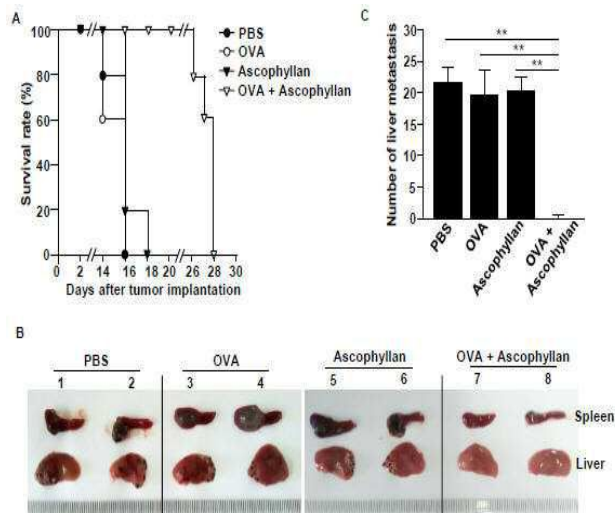
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 아스코필란을 유효성분으로 포함하는 애주번트 조성물

(57) 요약

본 발명은 아스코필란(ascophyllan)을 유효성분으로 포함하는 애주번트(adjuvant) 조성물 및 상기 애주번트 조성물과 표적 항원을 유효성분으로 포함하는 백신 조성물에 관한 것으로서, 구체적으로 상기 아스코필란은 비장 및 림프절에서의 수지상세포의 성숙을 유도하고, 성숙된 수지상세포에 의하여 Th1 세포 증재의 면역반응 및 CTL 활성을 증가시키며, 아스코필란 및 표적 항원을 함께 처리하는 경우 항원-특이적인 면역반응을 유도하여 암의 예방 또는 치료뿐만 아니라 암의 재발 또는 전이를 억제하는데 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

**A61K 39/0011** (2013.01)

A61K 2039/55511 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1525005408

부처명 해양수산부

연구관리전문기관 한국해양과학기술진흥원

연구사업명 해양수산생명공학기술개발사업

연구과제명 (핵심과제1) 해양융복합 바이오닉스 진단기기 개발

기 여 율 1/2

주관기관 부경대학교 산학협력단

연구기간 2016.01.01 ~ 2016.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2014R1A1A2059063

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공분야 기초연구사업

연구과제명 구형단백질의 모델이 되는 나노입자 라이브러리와 표면 물성에 따른 세포상호작용

기 여 율 1/2

주관기관 부경대학교 산학협력단

연구기간 2014.11.01 ~ 2017.04.30

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

아스코필란(ascophyllan)을 유효성분으로 포함하는 애주번트(adjuvant) 조성물.

#### 청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 아스코필란은 아스코필럼 노도숨(*Ascophyllum nodosum*)에서 분리된 것을 특징로 하는 조성물.

#### 청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 아스코필란은 비장 및 림프절에서의 수지상세포(dendritic cell; DC)의 성숙을 유도하는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 아스코필란은 Th1 세포 증재의 면역반응을 촉진시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 아스코필란은 CTL(Cytotoxic T Lymphocytes)의 활성을 증가시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 아스코필란은 종양을 가진 동물에서 수지상세포의 성숙에 의하여 면역반응의 활성을 유도하는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 7

제 1 항의 애주번트 조성물 및 표적 항원을 유효성분으로 포함하는 백신 조성물.

#### 청구항 8

제 7 항에 있어서,

상기 항원은 단백질, 재조합 단백질, 당단백질, 펩타이드, 다당류, 펩타이드 또는 폴리뉴클레오티드인 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 9

제 7 항에 있어서,

상기 항원은 세포, 박테리아 또는 바이러스인 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 10

제 7 항에 있어서,

상기 항원은 종양에 특이적인 항원인 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 11

제 7 항에 있어서,

상기 백신 조성물은 상기 표적 항원에 특이적인 항체의 생성을 유도하는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 12

제 7 항에 있어서,

상기 백신 조성물은 상기 표적 항원에 특이적인 CTL(Cytotoxic T Lymphocytes)의 활성을 유도하는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 13

제 7 항의 백신 조성물을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 14

제 7 항의 백신 조성물을 유효성분으로 포함하는 암의 재발 또는 전이 억제용 약학적 조성물.

### 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 아스코필란을 유효성분으로 포함하는 애주번트 조성물 및 상기 조성물과 표적 항원을 포함하는 백신 조성물에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 종양면역요법은 종양세포의 사멸을 유도하는 면역 반응을 유도하는 것이다(Finn OJ. The New England Journal of Medicine. 2008; 358(25):2704-2715). 효과적인 종양세포 사멸을 위해서는 T 세포 및 B 세포 면역반응을 유도해야 하며, 특히, 종양 항원에 대항하는 CTL(cytotoxic T lymphocyte) 활성 및 항원 특이적인 항체 생산이 중요하다(Banchereau J and Palucka AK. Nature Reviews Immunology. 2005; 5(4):296-306). 그러나, 종양 항원은 T 세포 및 B 세포 활성화에 대한 면역성이 거의 없고, 이는 DC(dendritic cell) 및 대식세포와 같은 항원제시세포가 MHC 분자로 적은 양의 종양 항원을 제시하고, 적은 양의 공동-활성 분자를 발현하기 때문이다 (Smith ME et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1989; 86(14):5557-5561; 및 Jager D, Jager E and Knuth A. Journal of Clinical Pathology. 2001; 54(9):669-674). 따라서, 종양 면역을 향상시키기 위해서는 DC 성숙을 유도할 수 있는 애주번트가 T 세포 및 B 세포 활성을 위하여 종양 항원과 함께 요구된다(Banchereau J and Palucka AK. Nature Reviews Immunology. 2005; 5(4):296-306).

[0003] DC는 T 세포 및 B 세포 면역에 중요한 조절인자이다. 자극원이나 항원에 노출되면, 미성숙의 DC는 성숙화 과정을 거쳐 비장 및 림프절(LN; lymph node)로 이동하고 T 세포 활성을 유도하고(Banchereau J and Palucka AK. Nature Reviews Immunology. 2005; 5(4):296-306; 및 Banchereau J and Steinman RM. Nature. 1998; 392(6673):245-252), 성숙된 DC는 특정 타입의 effector T 세포 및 CTL로 유도되도록 결정하게 하는 전-염증성 사이토카인을 생산하는 것으로 알려져 있다(Moser M and Murphy KM. Nature Immunology. 2000; 1(3):199-205; 및 Pooley JL, Heath WR and Shortman K. Journal of Immunology. 2001; 166(9):5327-5330). 다른 DC 서브셋은 다른 역할을 하는데, 마우스 비장 DC 중 소수 군인 CD8 $\alpha^+$  cDC (conventional DC)는 내재적 합성된 단백질을 교차-제시(cross-presentation)하는 능력이 있고, 마우스 비장 DC 의 주요 군인 CD8 $\alpha^-$  cDC는 세포 외 항원을 CD4 T 세포로 직접 제시하는 선택적 능력이 있다(Pooley JL, Heath WR and Shortman K. Journal of immunology. 2001; 166(9):5327-5330; Jin JO, Zhang W, Du JY, Wong KW, Oda T and Yu Q. PloS one. 2014; 9(6):e99396; Schnorrer P et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2006; 103(28):10729-10734; 및 Watts C. Nature Immunology. 2004; 5(7):685-692). 종양 백신은 종양세포의 사멸 활성을 위해 종양 항원에 특이적인 CTL 활성을 유도해야 하므로, CD8 $\alpha^+$  DC-중재의 종양 항원

에 대한 교차-제시가 매우 중요하며, Th 세포 반응이 없는 곳에서의 제한된 CTL 활성이므로, 성숙된 CD8 $\alpha^+$  DC에 의해 유도된 CD4 T 세포 활성이 요구된다(Schoenberger SP, Toes RE, van der Voort EI, Offringa R and Melief CJ. Nature. 1998; 393(6684):480-483).

[0004] 면역 애주번트 또는 면역항원보강제는 항원에 대항하여 면역 활성을 유도하는 것으로서, 천연의 다당류, 박테리아 산물 및 사이토카인의 일부가 알려져 있다(Afonso LC et al., Science. 1994; 263(5144):235-237; McSorley SJ, Ehst BD, Yu Y and Gewirtz AT. Journal of Immunology. 2002; 169(7):3914-3919; Luo M et al., Scientific reports. 2015; 5:11062; 및 Zhang W, Cho SY, Xiang G, Min KJ, Yu Q and Jin JO. PloS One. 2015; 10(6):e0130926). 해조류 다당류의 애주번트 기능은 타겟된 종양 면역성을 유도함으로써 종양 면역요법에 중요할 것으로 보여진다(Luo M et al., Scientific Reports. 2015; 5:11062).

[0005] 아스코필란은 갈조류인 *Ascophyllum nodosum* 으로부터 추출된 황산 다당류(sulfated polysaccharide)이다(Nakayasu S, Soegima R, Yamaguchi K and Oda T. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 2009; 73(4):961-964). 기존의 연구에서 아스코필란은 대식세포, NK 세포 및 비장 DC의 활성을 촉진시킨다는 것을 보여주었다(Nakayasu S, Soegima R, Yamaguchi K and Oda T. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 2009; 73(4):961-964; Nakano K, Kim D, Jiang Z, Ueno M, Okimura T, Yamaguchi K and Oda T. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 2012; 76(8):1573-1576; 및 Zhang W, Du JY, Jiang Z, Okimura T, Oda T, Yu Q and Jin JO. Marine Drugs. 2014; 12(7):4148-4164). 그러나, *in vivo* 종양 환경에서 면역세포 활성화에 대한 아스코필란의 효과는 조사되지 않았다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 1. 일본공개특허 제2008-120707호  
(특허문헌 0002) 2. 한국공개특허 제2016-0099780호

### 비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) 1. Zhang W, Du JY, Jiang Z, Okimura T, Oda T, Yu Q and Jin JO. Marine Drugs. 2014; 12(7):4148-4164.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 아스코필란을 유효성분으로 포함하는 애주번트(adjuvant) 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 애주번트 조성물 및 표적 항원을 유효성분으로 포함하는 백신 조성물을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 아스코필란(ascophyllan)을 유효성분으로 포함하는 애주번트(adjuvant) 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 아스코필란은 아스코필럼 노도숨(*Ascophyllum nodosum*)에서 분리된 것일 수 있다.

[0012] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 아스코필란은 비장 및 림프절에서의 수지상세포(dendritic cell; DC)의 성숙을 유도하는 것일 수 있다.

[0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 아스코필란은 Th1 세포 증재의 면역반응을 촉진시키는 것일 수 있다.

[0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 아스코필란은 CTL(Cytotoxic T Lymphocytes)의 활성을 증가시키는 것일 수

있다.

- [0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 아스코필란은 종양을 가진 동물에서 수지상세포의 성숙에 의하여 면역반응의 활성을 유도하는 것일 수 있다.
- [0017] 또한, 본 발명은 상기 애췌번트 조성물 및 표적 항원을 유효성분으로 포함하는 백신 조성물을 제공한다.
- [0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 항원은 단백질, 재조합 단백질, 당단백질, 펩타이드, 다당류, 펩타이드 또는 폴리뉴클레오티드인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 않는다. 예를 들어, 마우스의 경우 마우스에 특이적인 OVA(ovalbumin)을 항원으로서 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 항원은 세포, 박테리아 또는 바이러스인 것일 수 있다.
- [0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 항원은 종양에 특이적인 항원인 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 항원은 종양에 특이적인 항원으로서, 체내에서 항원에 대한 면역반응을 촉진함으로써, 추후 항원을 발현하는 암 세포가 발생하였을 때 암세포의 성장을 저해할 수 있어 암으로 예방 또는 치료할 수 있다.
- [0021] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 백신 조성물은 상기 표적 항원에 특이적인 항체의 생성을 유도하는 것일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 백신 조성물은 상기 표적 항원에 특이적인 CTL(Cytotoxic T Lymphocytes)의 활성을 유도하는 것일 수 있다.
- [0024] 또한, 본 발명은 상기 백신 조성물을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0025] 또한, 본 발명은 상기 백신 조성물을 유효성분으로 포함하는 암의 재발 또는 전이 억제용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0026] 본 발명은 백신 및 약학적으로 허용되는 비히클, 부형제 또는 담체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 적합한 비히클은, 예를 들어, 물, 염수, 텍스트로스, 글리세롤, 에탄올 등 및 이들의 조합물이다. 또한, 비히클은 습윤제 또는 에멀전화제, pH 완충제, 또는 애췌번트와 같은 그 밖의 부형제를 함유할 수 있다. 약학적으로 허용되는 담체는 본 발명의 약학적 조성물의 흡수 또는 제거율에 작용하는, 예컨대 안정화시키거나, 증가 또는 감소시키는 생리학적으로 허용되는 화합물을 함유할 수 있다. 생리학적으로 허용되는 화합물은, 예컨대 탄수화물, 예컨대 글루코스, 수크로스, 또는 텍스트란, 항산화제, 예컨대 아스코르브산 또는 글루타티온, 킬레이팅제, 저분자량 단백질, 세척제, 리포솜 담체, 또는 그 밖의 안정화제 및/또는 완충제를 포함할 수 있다. 부형제는 비이온성 계면활성제, 폴리비닐피롤리돈, 인간 혈청 알부민, 알루미늄 하이드록사이드, 마취 작용제, 및 다양한 변형되지 않고 유도체화된 사이클로텍스트린일 수 있다. 보다 바람직하게는, 비이온성 계면활성제는 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 40, 폴리소르베이트 60, 및 폴리소르베이트 80을 포함할 수 있다. 폴리비닐피롤리돈은 바람직하게는 약제 등급의 폴리비닐피롤리돈인 플라스돈(Plasdone) C15일 수 있다.
- [0027] 마취 작용제는 바람직하게는 벤질 알콜이다. 그 밖의 생리학적으로 허용되는 화합물은 습윤제, 에멀전화제, 분산제 또는 보존제를 포함한다. 본 발명의 약학적 조성물은 보조 물질, 예컨대 약리학적 작용제, 사이토카인, 또는 그 밖의 생물학적 반응 개질제를 포함할 수 있다. 그러한 부형제 또는 담체를 포함하는 약학적 조성물은 널리 공지된 통상적인 방법에 의해 제형화된다.
- [0028] 본 발명에 따른 백신은 하기 투여 경로용으로 제형화될 수 있다: 근내, 피내, 경구, 경피, 비강, 구강, 직장, 질, 흡입에 의해, 또는 피하 투여에 의해. 만족스러운 면역원성이 유도될 수 있는 한 다른 투여 방식도 적용될 수 있다.
- [0029] 본 발명의 약학적 조성물은 액체 용액 또는 현탁액으로서, 또는 주입 전에 액체 비히클에 용해 또는 현탁되기에 적합한 고체 형태로서, 주사가능하게 제조될 수 있다. 약학적 조성물은 또한 에멀전화된 고체 형태 또는 지속적인 전달에 사용하기 위해 리포솜 비히클 또는 다른 미립자 담체에 캡슐화된 활성 성분으로 제조될 수 있다. 예를 들어, 약학적 조성물은 오일 에멀전, 유중수 에멀전, 수중유중수 에멀전, 부위-특이적 에멀전, 장기-체류에멀전, 점착성 에멀전, 마이크로에멀전, 나노에멀전, 리포솜, 미세입자, 미세구체, 나노구체, 나노입자 및 다양한 천연 또는 합성 중합체, 예컨대 재흡수불가능한 불침투성 중합체, 예컨대 에틸렌비닐 아세테이트 공중합체

및 Hytrel® 공중합체, 팽윤성 중합체, 예컨대 하이드로겔, 또는 재흡수가능한 중합체, 예컨대 콜라겐 및 특정 폴리산 또는 폴리에스테르, 예컨대 백신의 지속적인 방출을 가능케 하는, 재흡수가능한 봉합을 하는데 이용되는 것들의 형태일 수 있다.

[0030] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 암은 유방암, 폐암, 식도암, 직장암, 담도암, 간암, 협착암, 위암, 결장암, 인두암, 신장/콩팥암, 뇌 종양, 전립선암, 난소암, 자궁경부암, 자궁내막암, 췌장암, 고환암, 방광암, 두경부암, 구강암, 신경내분비암, 부신피질암, 갑상샘암, 골암 및 피부암(예컨대, 기저 세포 암종, 편평 세포 암종 또는 흑색종)으로부터 선택되는 어느 하나인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0031] 본 발명에서, 백신의 유효량은 표적 항원에 대하여 IgG 생성을 자극하는 것과 같이 면역학적 효과를 유도할 수 있는 양이다. 백신의 유효량 또는 용량은 표적 항원의 양, 애주번트의 유형, 투여 방식 및 치료되는 피검체의 연령, 크기 및 조건에 따라 달라질 수 있다.

[0032] 백신은 수 개월 내지 수 년 간의 장기 면역 보호 효과를 달성하기 위해, 특정 시간 간격으로 1회 이상의 추가 용량과 함께 또는 없이 일정한(stat) 용량으로 투여될 수 있다. 투여 빈도는 증상의 중증도, 요망되는 면역보호의 정도, 약학적 조성물이 예방용 또는 치료용으로 사용되었는지 여부 등과 같은 임의의 다양한 인자에 의존적일 수 있다. 예를 들어, 한 구체예에서, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 매월 1회, 매월 2회, 매월 3회, 격주(qow), 매주 1회(qw), 매주 2회(biw), 매주 3회(tiw), 매주 4회, 매주 5회, 매주 6회, 격일(qod), 매일(qd), 하루에 2회(qid), 또는 하루에 3회(tid) 투여된다. 백신은 또한 화학요법, 표적 요법 또는 암 치료용 종양 관련 탄수화물 항원을 표적화하는 항체와 같은 그 밖의 통상적인 요법과 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다.

### 발명의 효과

[0034] 본 발명에 따른 아스코필란은 종양을 가진 동물에서 비장 및 림프절에서의 수지상세포의 성숙을 유도하고, 성숙된 수지상세포에 의하여 Th1 세포 중재의 면역반응 및 CTL 활성을 증가시킴으로써 애주번트로서 이용할 수 있고, 상기 애주번트 및 종양 특이적인 항원을 함께 투여하여 면역화를 유도할 수 있는 백신으로 이용하여 상기의 면역반응을 유도하여 암의 예방 또는 치료뿐만 아니라 암의 재발 또는 전이를 억제하는데 유용하게 사용할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0036] 도 1은 종양을 가진 마우스에 아스코필란의 *in vivo* 투여에 대한 결과를 나타낸 것이다. (A)는 비장 및 종양 drLN에서의 lineage<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup> DC의 퍼센트를 유세포분석기에서 분석한 결과이며, (B)는 비장(왼쪽 패널) 및 종양 drLN(오른쪽 패널)의 살아있는 세포에서 lineage<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup> DC의 절대적의 수의 평균을 나타낸 것이며, (C)는 비장 및 종양 drLN에서의 lineage<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup> DC에서 CCR7의 발현량을 측정된 것이고, (D)는 비장세포에서의 CCL19 및 CCL21의 발현량은 real-time PCR로 분석한 결과이며, (E)는 마우스에서 분리한 DC를 CellVeu Maroon으로 레이블링하고 레이블된 DC의 이동을 유세포분석기로 분석한 결과이고, (F)는 비장 및 종양 drLN에서의 lineage<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup> DC에서 공동-자극 분자, MHC class I 및 II의 유세포 분석 결과를 나타낸 것이며, (G)는 혈청에서의 IL-6, IL-12p70 및 TNF-α의 양을 측정된 결과이고, (H)는 비장 DC의 세포 내의 IL-6, IL-12 및 TNF-α의 생산을 분석한 결과이다(\**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01).

도 2는 종양을 가진 마우스에서 아스코필란에 의한 Th1 및 Tc1 면역반응의 촉진 여부에 대한 결과를 나타낸 것이다. (A)는 비장 및 종양 drLN 내에 있는 CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> T 세포에서 IFN-γ<sup>+</sup>, IL-17<sup>+</sup>, TNF-α<sup>+</sup>, 및 IL-4<sup>+</sup>의 퍼센트를 나타낸 것이고, (B)는 비장(위쪽 패널) 및 종양 drLN(아래쪽 패널)에서의 살아있는 세포 내의 IFN-γ<sup>+</sup> 및 TNF-α<sup>+</sup> 세포의 절대적인 수의 평균을 나타낸 것이며, (C)는 혈청에서의 IFN-γ 및 TNF-α의 양을 나타내며, (D)는 비장세포에서의 T-bet, IFN-γ, IL-4 및 IL-17A의 발현량은 real-time PCR로 분석한 결과이다(\*\**p* < 0.01).

도 3은 종양을 가진 마우스에서 아스코필란에 의한 항원 제시 CD4 및 CD8 T 세포 증식에 대한 결과를 나타낸 것

이다. (A)는 비장에서 lineage<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 및 lineage<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cDC의 퍼센트를 유세포분석기로 분석한 결과(위쪽 패널) 및 MHC class I 및 II의 발현량(아래쪽 패널)에 대한 결과이고, (B)는 비장에서 살아있는 세포 내의 CD11c<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 및 CD11c<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cDC의 절대적인 수의 평균을 나타낸 것이며, (C)는 CD11c<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 및 CD11c<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cDC에서 OVA 펩타이드의 제시(presentation)를 유세포분석기에 의해 분석한 결과를 나타낸 것이고, (D)는 OT-I 또는 OT-II 마우스에서 분리된 CD8 T 세포 또는 CD4 T 세포를 CFSE로 레이블링시키고, B16 종양을 가진 CD45.1 컨지닉 마우스에 이식한 후, 아스코필란-OVA 조합의 효과를 CFSE dilution으로 결정되는 세포의 증식을 비교한 결과를 나타낸 것이며, (E)는 종양에 있는 OT-I 세포(왼쪽 패널) 및 OT-II 세포(오른쪽 패널)의 절대적인 수의 평균을 나타낸 것이고, (F)는 종양-침윤된 OT-I 및 OT-II 세포에서 IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> 및 TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> 세포의 퍼센트를 분석한 결과를 나타낸 것이다(\*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ ).

도 4는 아스코필란-OVA 조합의 처리에 의한 B16-OVA 종양 성장의 억제 효과를 나타낸 결과이다. (A)는 마우스의 오른쪽 면에 이식된 B16-OVA 종양 성장 커브를 나타낸 것이고, (B)는 B16-OVA 종양 세포 이식 후 28일째에 측정된 종양 덩어리의 크기를 나타낸 것이며, (C)는 마우스의 생존율을 나타낸 것이고, (D)는 마우스의 오른쪽 면에 B16-OVA 세포를 접종한 후 16일째에 왼쪽 면에 다시 접종하여 왼쪽 면에 이식된 종양 성장 커브를 나타낸 것이며, (E)는 초기 종양 이식 후 28일째에서 왼쪽 면에 이식된 종양 덩어리의 크기를 나타낸 것이고, (F)는 왼쪽 면에 종양을 가진 마우스의 퍼센트를 나타낸 것이다(\*\* $p < 0.01$ ).

도 5는 OVA-유도의 B 및 T 세포 면역반응에서 아스코필란에 의한 애주버트 효과를 나타낸 결과이다. (A)는 면역화 후 35일째에 혈청의 OVA-특이적 IgG1(왼쪽 패널) 및 IgG2(오른쪽 패널)의 농도를 ELISA에 의하여 측정된 결과이고(OVA 그룹에서 \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , PBS 그룹에서 # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ ), (B)는 면역화 후 35일째에서, 비장세포는 4일 동안 OVA(50  $\mu$ g/ml)를 처리 또는 처리 없이 재-자극되었고, 이후 비장세포의 증식률이 측정된 결과이며, (C)는 상기 비장세포의 배양된 상층액에서의 IFN- $\gamma$  농도를 보여주는 결과이고, (D)는 CD4 또는 CD8 T 세포에서의 CD44 발현량을 유세포분석기로 분석한 결과이고(왼쪽 패널), CD44<sup>+</sup> 세포의 평균 퍼센트로 나타낸 결과(오른쪽 패널)이다(\*\* $p < 0.01$ ).

도 6은 B16-OVA 흑색종 세포에 의한 암형성에서 아스코필란-OVA의 면역화에 의한 억제 효과를 나타낸 결과이다. (A)는 종양을 가진 마우스의 퍼센트를 나타낸 것이고, (B) 28일에서의 종양을 가진 마우스의 모습을 나타낸 것이며, (C)는 종양 성장 곡선을 나타낸 것이고(\* $p < 0.01$ ), (D)는 면역화 후 35일째에 *in vivo*에서의 CTL 활성이 유세포분석기에 의하여 측정된 결과이고, 닷플렛은 SIINFEK-주입된 CFSE<sup>+</sup> 세포 및 비-펩타이드-주입된 CMTMR<sup>+</sup> 세포의 퍼센트를 나타낸 결과(위쪽 패널)이고, 항원-특이적 세포용해의 평균 퍼센트 값을 나타낸 결과(아래쪽 패널)이다(\*\* $p < 0.01$ ).

도 7은 아스코필란-OVA 면역화에 의한 간으로의 B16-OVA 흑색종 전이의 억제 효과를 나타낸 결과이다. (A)는 마우스의 생존율을 나타내는 것이고, (B)는 종양 주입 후 10일째에 비장에서의 종양 덩어리의 크기 및 간으로의 B16-OVA 세포의 전이를 나타낸 것이며, (C)는 간으로의 B16-OVA 전이의 절대적 수의 평균 값을 나타낸 것이다(\*\* $p < 0.01$ ).

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

## [0039] 실시예 1. 실험재료 및 방법

### [0040] 1.1. 마우스 및 세포주

[0041] C57BL/6 마우스(6주령), OT-I 및 OT-II TCR 형질전환(trangenic)된 마우스, 및 C57BL/6-Ly5.1 (CD45.1) 컨지닉(congenic) 마우스는 Shanghai Public Health Clinical Center(Shanghai, CN)로부터 구입하였고, 병원균없는 환경에서 유지되었다. 마우스는 표준 설치류 음식 및 물에 대하여 자유롭게 접근할 수 있고, 조절된 온도(20-22℃), 습도(50-60%) 및 빛(12시간 명: 12시간 암)의 조건에서 유지되었고, 모든 실험은 Shanghai Public Health Clinical Center에 있는 실험동물윤리위원회(Institutional Animal Care and Use committee)의 가이드라인에 따라 수행되었다. 프로토콜은 Shanghai Public Health Clinical Center의 동물실험 윤리위원회에 의해 승인되었

다(Mouse Protocol Number: SYXK-2010-0098). 마우스는 CO<sub>2</sub> 흡입 안락사되었고, 고통을 최소화하도록 노력하였다. OVA(ovalbumin)를 발현하는 B16F10(murine melanoma cell line; CRL-6475, ATCC)은 RPMI 1640(Sigma Aldrich) 에서 배양되었다(10% FBS, 2 mM glutamine, 1 M HEPES, 100 µg/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin, 및 2 mM 2-mercaptoethanol). 모든 세포주는 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양되었다.

## 1.2. 화학 물질

아스코필란(ascophyllan)은 기존에 기재한 대로 분쇄된 *Ascophyllum nodosum* 으로부터 준비되었다(Nakayasu S, Soegima R, Yamaguchi K and Oda T. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 2009; 73(4):961-964; 및 Jiang Z, Okimura T, Yamaguchi K and Oda T. Biology and Chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society. 2011; 25(4):407-415). 아스코필란 용액은 내독소(endotoxin)-제거 컬럼(Detoxi-gel: Thermo Fisher Scientific)을 통과시켰고, 순차적으로 내독소-제거 필터(Zetapor Dispo: Wako)를 통과시켰다. 정제된 아스코필란에서의 내독소량은 LAL(Limulus ameobocyte lysate) assay kit(Lonza)을 사용하여 평가되었다. H2-K<sup>b</sup> restricted peptide OVA257-264 (SIINFEKL; 서열번호 1)은 Chinapeptides (China)에서 구입되었다.

## 1.3. 항체

Isotype control Abs(antibodies) (IgG1, IgG2a or IgG2b), CD11c (HL3), CD4 (GK1.5), CD8 α (YTS169.4), CD40 (3/23), CD80 (16-10A1), CD86 (GL-1), CCR7 (4B12), anti-IL-4 (11B11), anti-IL-6 (MP5-20F3) 및 anti-IL-12/23p40 (C17.8)은 BioLegend에서 구입되었고; anti-MHC class I (AF6-88.5.3), anti-MHC class II (M5/114.15.2), anti-IFN-γ (XMG1.2), anti-IL-17 (TCC11-18H10.1) and anti-TNF-α (MP6-XT22)은 eBioscience에서 구입되었다.

## 1.4. 유세포분석

세포는 0.5% BSA를 포함하는 PBS(phosphate buffered saline)에서 세척되었고, 레이블되지 않은 isotype control Abs로 15분 동안 전처리된 후, 30분 동안 얼음통에서 fluorescence-conjugated Abs에 의해 레이블되고 PBS로 세척되었다. 세포는 FACS Aria II (Becton Dickinson)와 FlowJo 8.6 software (Tree Star)로 분석되었다. 세포의 잔해는 포워드 및 사이드-스캐터 게이팅에 의한 분석에서 제외되었다. 또한, 죽은 세포는 7AAD (7 aminoactinomycin D; BioLegend) 염색과 7AAD-negative population에 대한 게이팅에 의해 제외되었다. 비-특이적인 염색을 위한 대조군으로서, isotype-matched irrelevant mAbs가 사용되었다.

## 1.5. DC(dendritic cell) 분석

비장(spleen)과 종양 drLN(tumor draining lymph node; 림프절)의 DCs(dendritic cells)가 기존에 보고된 바와 같이 분석되었다(Jin JO, Zhang W, Du JY, Wong KW, Oda T and Yu Q. PloS One. 2014; 9(6):e99396; 및 Zhang W, Du JY, Jiang Z, Okimura T, Oda T, Yu Q and Jin JO. Marine Drugs. 2014; 12(7):4148-4164). 간단하게, 조직은 작은 조각으로 잘리고, 상온에서 20분 동안 콜라게네이즈를 포함하는 2% FBS(fetal bovine serum)로 분해하였다. 분해된 세포는 원심분리되었고, 펠릿은 5 ml의 histopaque (Sigma-Aldrich)로 재용해시켰다. 이후, 1700g에서 10분 동안 원심분리하여 추가된 histopaque 가 아래 층으로 구성되고, EDTA-FBS 가 위쪽 층으로 배치되었다. 가벼운 밀도층(light density fraction; < 1.077 g/cm<sup>3</sup>)이 모아지고, 다음의 FITC-conjugated mAbs (monoclonal antibodies)로 30분 동안 처리되었다: anti-CD3 (17A2), anti-Thy1.1 (OX-7), anti-B220 (RA3-6B2), anti-Gr1 (RB68C5), anti-CD49b (DX5) 및 anti-TER-119 (TER-119). lineage<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup> 세포는 cDCs로 정의하였고, CD8 α<sup>+</sup> 및 CD8 α<sup>-</sup> cDCs로 분류하였다. 분석은 FACS Aria II (Becton Dickinson)로 수행되었다.

## 1.6. DC(dendritic cell) 이동 어세이

[0056] CD11c<sup>+</sup> spleen DCs 는 C57BL/6 마우스에서 biotin-conjugated anti-CD11c Abs (Miltenyibiotec)에 의해 분리되었고, 세포는 CellVue Maroon cell labeling kit (eBioscience)로 레이블되었다. 이후, 레이블된 세포는 종양이 있는 마우스로 전달되었고, 마우스는 DC 전달한 1 시간 후에 아스코필란-처리없이 또는 아스코필란을 처리하였다. 비장 및 종양 drLN(tumor draining lymph node)으로 이동한 세포는 lineage<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup> 세포로부터 유세포분석기에 의해 분석되었다.

[0058] 1.7. *Ex vivo* T 세포 자극 및 세포 내의 사이토카인 염색

[0059] 기존에 자세하게 기재된 바와 같이(Jin JO, Han X and Yu Q. Journal of autoimmunity. 2013; 40:28-44), 비장 및 종양 drLN으로부터 준비된 단세포 현탁액은 PMA(phorbol 12-myristate 13-acetate, 50 ng/ml; Calbiochem)와 이오노마이신(ionomycin, 1 μM; Calbiochem)으로 4시간 동안 *in vitro*에서 자극되었고, 최종 2시간 동안 모넨신 용액(monensin solution; Biolegend)이 추가되었다. 양성 대조군으로는 C57BL/6 마우스로부터의 비장세포(splenocytes, 2 x 10<sup>6</sup>/ml)가 용해성의 anti-CD3 (1 μg/ml)과 anti-CD28 (1 μg/ml)으로 3일 동안 자극된 것을 사용하였다. IL-4 (Peprotech) 또는 IL-6 (Peprotech)가 배양액에 추가되었다. 이후, 각각 세포 내의 IL-4 및 IL-17 생산이 측정되었다. 세포 내의 사이토카인 염색을 위하여, 세포는 먼저 표면분자가 염색되었고, Cytofix/Cytoperm buffer (eBioscience)로 고정되고 투과되었으며, 순차적으로 30분 동안 Perm/Wash buffer (eBioscience)에 들어있는 anti-cytokine 항체로 배양되었다. isotype control IgGs로의 대조군 염색은 모든 실험에서 수행되었다.

[0061] 1.8. ELISA

[0062] 혈청에 있는 IL-6, IL-12p70, IFN-γ 및 TNF-α의 농도는 standard ELISA kits (Biolegend)으로 세 번 반복하여 측정되었다.

[0064] 1.9. Real-time PCR

[0065] 총 RNA는 Oligo (dT)와 M-MLV reverse transcriptase (Promega)를 사용하여 역전사시켰다. cDNA는 real-time PCR amplification kit(Qiagen)를 사용하여 60 °C의 어닐링 온도로 하여 40 사이클을 반복하였고, LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche)을 사용하였다. 프라이머 서열은 하기의 표 1과 같다.

표 1

[0067]

| 유전자           | 프라이머 방향 | 서열번호                                   |
|---------------|---------|----------------------------------------|
| mouse β-actin | forward | 5'-TGGATGACGATATCGCTGCG-3' (서열번호 2)    |
|               | reverse | 5'-AGGGTCAGGATACCTCTCTT-3' (서열번호 3)    |
| CCL19         | forward | 5'-CTGCCTCAGATTATCTGCCAT-3' (서열번호 4)   |
|               | reverse | 5'-AGGTAGCGGAAGGCTTTCAC-3' (서열번호 5)    |
| CCL21a        | forward | 5'-ATCCCGCAATCCTGTTCTC-3' (서열번호 6)     |
|               | reverse | 5'-GGTTCCTGCACCCAGCCTTC-3' (서열번호 7)    |
| T-bet         | forward | 5'-CAACAACCCCTTGCCAAAG-3' (서열번호 8)     |
|               | reverse | 5'-TCCCCAAGCATTGACAGT-3' (서열번호 9)      |
| IFN-γ         | forward | 5'-GGATGCATTTCATGAGTATTGC-3' (서열번호 10) |
|               | reverse | 5'-CTTTTCCGCTTCCTGAGG-3' (서열번호 11)     |
| IL-4          | forward | 5'-ACAGGAGAAGGACGCCAT-3' (서열번호 12)     |
|               | reverse | 5'-GAAGCCCTACAGACGAGCTCA-3' (서열번호 13)  |
| IL-17A        | forward | 5'-GCGCAAAAGTGAGCTCCAGA-3' (서열번호 14)   |
|               | reverse | 5'-ACAGAGGGATATCTATCAGGG-3' (서열번호 15)  |

- [0069] **1.10. 마우스 면역화**
- [0070] C57BL/6 마우스는 PBS alone; 2.5 mg/kg의 OVA(in PBS); 50 mg/kg의 아스코필란(in PBS); 또는 OVA-아스코필란 (in PBS)으로 0, 15 및 30일에 정맥주사(*i.v.*)로 면역화되었다. 35일에는 마우스를 희생하여 혈청을 모았고, 추가 분석을 위하여 비장세포를 분리하였다. 마우스의 일부는 B16-OVA 흑색종으로 형성되었다.
- [0072] **1.11. OVA-특이적인 항체 분석**
- [0073] 기존에 상세하게 기재된 바와 같이(Jin JO, Zhang W, Du JY, Wong KW, Oda T and Yu Q. PloS one. 2014; 9(6):e99396), 96-well plate는 OVA (10  $\mu$ g/ml)로 코팅되었고, 1% BSA(bovine serum albumin)로 블러킹되었다. 혈청 샘플은 희석되어 각 웰에 더해지고, biotin-conjugated anti-mouse IgG1 와 IgG2a (Biolegend) 및 streptavidin-conjugated HRP(Horseradish peroxidase)이 더해졌다. 반응은 TMB substrate (Sigma)로 현상되고, A<sub>650</sub> 가 plate reader를 사용하여 측정되었다.
- [0075] **1.12. OT-I 및 OT-II T 세포 증식**
- [0076] OT-II 마우스로부터의 CD4 T 세포 또는 OT-I 마우스로부터 CD8 T 세포가 CD4 T cell or CD8 T cell isolation kit (Miltenyi Biotec)을 사용하여 비장으로부터 각각 분리되었다. 세포는 10  $\mu$ M CFSE (Invitrogen)를 포함하는 0.1% BSA(in PBS)에서 현탁되었고 10분동안 배양되었다. CFSE-레이블된 세포( $1 \times 10^6$ )는 CD45.1 컨지닉 마우스에 정맥주사(*i.v.*)로 전달되었고, 24시간 후 마우스에 PBS alone; 2.5 mg/kg의 OVA(in PBS); 또는 OVA-아스코필란(in PBS)으로 주입되었다. 면역된 후 72 시간에는 비장세포가 모아지고, 유세포분석기를 통해 CFSE 형광 밀도를 분석함으로써 OT-I 또는 OT-II T 세포 증식이 결정되었다.
- [0078] **1.13. *In vivo* 세포 독성 분석**
- [0079] 마우스에는 CFSE (2, 20 또는 200 nM)로 구별하여 레이블된 비장세포의 혼합물을 정맥주사로 주입되었고, 1, 10, 또는 100 nM SIINFEKL 펩타이드가 주입되었다. 또한, 10 mM CellTracker™ Orange CMTMR (Life technologies)로 레이블된 비장세포가 주입된 마우스에는 상기 펩타이드가 주입되지 않았다. 마우스 당 총  $10 \times 10^6$  세포가 주입되었고, 이는 각 타겟 세포군을 포함하는 혼합물로 이루어진 것이다. 비장세포는 타겟 세포의 주입 후 24시간 후에 모아졌다. 생존 타겟 세포의 존재는 7-AAD (7-aminoactinomycin D)에 의한 제외로 결정되었다. 죽은 세포의 퍼센트는 기존에 기재된 공식을 사용하여 계산되었다(Hermans IF, Silk JD, Yang J, Palmowski MJ, Gileadi U, McCarthy C, Salio M, Ronchese F and Cerundolo V. Journal of immunological methods. 2004; 285(1):25-40).
- [0081] **1.14. 비장내(intrasplenic) 주입**
- [0082] C57BL/6 마우스는 케타민 혼합물(10  $\mu$ L ketamine HCl, 7.6  $\mu$ L xylazine, 2.4  $\mu$ L acepromazine maleate, 및 10  $\mu$ L H<sub>2</sub>O)을 복막강으로 주입하여 마취하였다. B16-OVA 흑색종 세포( $0.5 \times 10^6$  /50  $\mu$ L)는 실험을 위한 열린 개복술(open laparotomy) 동안 마우스의 비장으로 주입되었다.
- [0084] **1.15. 통계분석**
- [0085] 결과는 평균±표준오차(SEM; standard error of the mean)로 표현하였다. 실험군 사이의 통계적 유의성은 Bonferroni post-test 또는 unpaired Student's t-test에 의한 분산분석(analysis of variance)을 사용하여 계산되었다. *p-value* <0.05 가 유의한 것으로 간주되었다.
- [0087] **실시예 2. 종양환경에서 아스코필란에 의한 DC 활성 유도 결과**

- [0088] 본 발명자들의 기존 연구에서, 아스코필란은 비장의 DC 성숙화를 유도하는 것으로 나타났다(Zhang W, Du JY, Jiang Z, Okimura T, Oda T, Yu Q and Jin JO. Marine drugs. 2014; 12(7):4148-4164). 본 발명에서는 아스코필란이 종양을 가진 마우스(tumor-bearing mice)에서 DC의 성숙을 유도할 수 있는지를 확인하였다. C57BL/6 마우스에는  $1 \times 10^6$  B16 흑색종 세포가 피하(s.c.)로 주입되었다. 종양이 잘 형성되면, 종양을 가진 마우스에 50 mg/kg의 아스코필란을 정맥(i.v.)주사하였고, 24시간 뒤에 비장과 종양 drLN에 있는 DC의 활성을 분석하였다. 아스코필란의 처리는 비장과 종양 drLN에 있는 DC의 비율 및 수에서 현저한 증가를 유도한 것으로 나타났다(도 1A 및 1B). 이동하는 DC의 마커(Jang MH et al., Journal of immunology. 2006; 176(2):803-810)이고, 비장 DC 및 종양 drLN에 존재하고, 비장에서 CCL9(C-C motif ligand 19) 및 CCL21가 리간드인 CCR7(C-C chemokine receptor 7)의 발현량은 아스코필란에 의하여 상당히 증가되었음을 확인하였다(도 1C 및 1D). 아스코필란이 DC 이동의 촉진하는지를 결정하기 위하여, 본 발명자들은 종양을 가진 마우스에 CellVue Maroon-레이블된 DC를 전달(transfer)하였고, 전달 후 2시간 뒤에 아스코필란을 처리하였다. 더욱이, 비장 및 종양 drLN의 DC에 있는 공동-촉진 분자와 MHC class I 및 II의 발현량이 아스코필란에 의하여 상당히 상향 조절되었다(도 1F).
- [0089] 성숙된 DC가 IL-6, IL-12 및 TNF- $\alpha$ 를 포함하는 전-염증성 사이토카인을 분비한다는 것은 잘 알려져 있다(Banchereau J and Palucka AK. Nature reviews Immunology. 2005; 5(4):296-306). 따라서, 본 발명자들은 아스코필란이 종양을 가진 마우스의 DC에 의해 전-염증성 사이토카인의 생산을 촉진시킬 수 있는지를 실험하였다. 종양을 가진 마우스에 아스코필란의 처리를 한 후 24시간 뒤에 혈청 사이토카인의 양을 분석하였다. 도 1G에서와 같이, IL-6, IL-12p70 및 TNF- $\alpha$ 의 양은 PBS가 처리된 종양을 가진 마우스와 비교하여 상당히 증가되었다. 본 발명자들은 상기 사이토카인이 아스코필란에 의해 촉진된 DC에 의해 생산되는지를 결정하기 위하여, 비장 DC에서의 세포 내 사이토카인의 생산을 분석하였다. 도 1H에서와 같이, 아스코필란의 처리는 종양을 가진 마우스의 비장에서 IL-6, IL-12 및 TNF- $\alpha$ 를 생산하는 DC의 퍼센트에서 현저한 증가를 유도하였다.
- [0090] 따라서, 아스코필란은 종양을 가진 마우스에서 비장 및 종양 drLN으로 DC의 이동을 유도할 수 있고, DC의 활성을 촉진시킬 수 있음을 확인하였다.
- [0092] **실시예 3. 종양을 가진 마우스(tumor-bearing mice)에서 아스코필란에 의한 Th1 및 Tc1 반응의 촉진 결과**
- [0093] 아스코필란이 종양을 가진 마우스에서 DC 활성을 유도하기 때문에, 본 발명자들은 종양을 가진 마우스에서 아스코필란-유도의 DC 활성이 T 세포 면역 반응을 촉진시킬 수 있는지 실험하였다. B16 흑색종이 마우스에서 형성되면, 마우스는 50 mg/kg의 아스코필란에 의해 3일 간격으로 두 번 정맥(i.v.) 주사되었고, 두번째 주사 후 3일 뒤에 분석되었다. 아스코필란의 처리는 비장 및 종양 drLN에 있는 IFN- $\gamma$  및 TNF- $\alpha$ 를 생산하는 CD4 및 CD8 T 세포의 비율에 있어 상당한 증가를 유도한 반면, IL-4 또는 IL-17을 생산하는 CD4 및 CD8 T 세포는 아스코필란의 처리에 의해 증가되지 않았다(도 2A). 유세포분석 데이터에서도 일치하게, 비장 및 종양 drLN에 있는 IFN- $\gamma$  및 TNF- $\alpha$ 를 생산하는 CD4 및 CD8 T 세포의 수는 아스코필란의 처리에 의하여 유의하게 증가되었다(도 2B). 또한, IFN- $\gamma$  및 TNF- $\alpha$ 의 혈청에서의 양은 종양을 가진 마우스에서 아스코필란의 처리에 의하여 현저하게 상승되었다(도 2C). 더욱이, 비장세포에서 T-bet(Th1 및 Tc1 세포에 대한 중요한 전사인자) 및 IFN- $\gamma$ 의 mRNA 발현량은 아스코필란의 처리에 의해 상당히 증가된 반면, IL-4 및 IL-17A mRNA 발현량은 아스코필란에 의해 변화되지 않았다(도 2D).
- [0094] 따라서, 아스코필란의 처리는 종양을 가진 마우스에서 Th1 및 Tc1 면역 반응을 촉진시킬 수 있음을 확인하였다.
- [0096] **실시예 4. 종양을 가진 마우스(tumor-bearing mice)에서 아스코필란에 의한 항원 제시(antigen presentation) 및 항원-특이적인 T 세포 증식의 향상**
- [0097] 다른 집합의 DC는 항원 제시에 있어 다른 전문화된 기능을 보이는 것으로 알려져 있다(Schnorrer P et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2006; 103(28):10729-10734). 아스코필란이 종양을 가진 마우스에서 항원 제시 또는 교차-제시(cross-presentation)를 촉진할 수 있는지를 결정하기 위하여, 본 발명자들은 PBS, OVA (ovalbumin) 또는 아스코필란-OVA를 종양을 가진 마우스에 주입하였다. 24시간 후, MHC class I 및 II의 발현량이 비장 CD8 $\alpha^+$  및 CD8 $\alpha^-$  cDC에서 측정되었다.
- [0098] 그 결과, 아스코필란과 OVA의 조합은 OVA 단독으로 처리된 마우스에 비교하여 CD8 $\alpha^+$  및 CD8 $\alpha^-$  cDC 모두에서

MHC class I 및 II의 발현량이 현저한 상향 조절을 촉진시켰다(도 3A). 또한, 비장에 있는  $CD8\alpha^+$  및  $CD8\alpha^-cDC$ 의 수는 아스코필란-OVA의 조합에 의해 유의적으로 증가되었다(도 3B). 아스코필란-OVA 조합을 처리한  $CD8\alpha^+$  및  $CD8\alpha^-cDC$ 는 OVA 또는 아스코필란 단독으로 처리한 것보다 높은 퍼센트의 OVA 펩타이드 제시를 보여주었다(도 3C).

[0099] 다음으로, 항원 특이적인 T 세포 증식을 결정하기 위하여, 본 발명자들은 CFSE-레이블된 OT-I 및 OT-II 세포를 종양을 가진 CD45.1 컨지닉 마우스로 전달하였고, 24시간 후, 마우스는 PBS, OVA, 아스코필란 또는 아스코필란-OVA에 의해 3일 동안 처리되었다. OVA 및 아스코필란 단독이 아닌, 아스코필란-OVA 조합은 비장에서 OT-I 및 OT-II T 세포의 증식에 있어 현저한 증가를 유도하였다(도 3D). 또한, 종양이 잠입된 OT-I 및 OT-II 세포의 수는 아스코필란-OVA의 조합을 처리한 마우스에서 강하게 증가되었다(도 3E). 더욱이, 아스코필란-OVA의 조합을 처리한 마우스에서 종양이 잠입된 OT-I 및 OT-II 세포에서의 IFN- $\gamma$  및 TNF- $\alpha$ 의 세포 내 생산은 아스코필란 또는 OVA 단독으로 처리된 군과 비교하여 상당히 증가되었다(도 3F).

[0100] 따라서, 아스코필란은 종양을 가진 마우스에서 항원 특이적인 T 세포 반응을 촉진시키고 면역성 애쥬번트(immunogenic adjuvant)로서 기능함을 확인하였다.

#### [0102] 실시예 5. 아스코필란-OVA 면역화에 의한 B16-OVA 종양 세포의 성장 억제 효과

[0103] 아스코필란은 종양을 가진 마우스에서 DC 및 항원 특이적인 T 세포 활성을 촉진시키기 때문에, 본 발명자들은 아스코필란이 종양 면역치료제에서 효과적인 애쥬번트로서 사용될 수 있음을 실험하였다. 우선, 본 발명자들은 종양을 가진 마우스에 치료적 백신을 위한 애쥬번트로서 아스코필란의 효과를 평가하였다. C57BL/6 마우스에는  $1 \times 10^6$  B16-OVA 흑색종 세포가 마우스의 오른쪽 면에 피하(s.c.)로 접종되었다. 7일 후, 종양이 잘 형성되면, 마우스는 PBS, OVA (ovalbumin), 아스코필란 또는 아스코필란-OVA로 정맥주사되었고, 7일 뒤에 같은 시약으로 다시 처리되었다. 초기 종양세포의 접종 후 16일 째에 마우스에는 같은 수의 B16-OVA 세포가 마우스의 왼쪽 면에 다시 접종되었다.

[0104] 그 결과, 아스코필란-OVA 조합에 의한 처리는 마우스 오른쪽 면에 있는 B16-OVA 종양의 성장을 현저하게 억제시켰다(도 4A). 도 4B에서와 같이, 아스코필란-OVA 조합으로 처리된 마우스는 OVA 또는 아스코필란 단독으로 처리된 마우스와 비교할 때, 28일에서 상당히 작은 종양 덩어리를 보여주었다. 더욱이, 아스코필란-OVA의 조합을 처리한 마우스는 PBS, OVA 또는 아스코필란 단독으로 처리한 마우스보다 더 오래 생존하였다(도 4C). 또한, OVA 또는 아스코필란 단독으로 처리한 마우스에서는 두 번째 종양이 유도된 왼쪽 면의 종양 덩어리가 오른쪽 면의 초기 종양 형성 후 28일 째에 확인된 반면, 아스코필란-OVA 조합으로 처리된 마우스에서는 완전하게 두 번째 종양이 형성되지 않았다(도 4D, 4E 및 4F). 이는 아스코필란-OVA의 조합이 OVA 항원에 대한 장기 메모리 면역반응의 형성을 유도한다는 것을 의미한다.

[0105] 따라서, 아스코필란은 치료적 백신 애쥬번트로서 기능할 수 있음을 확인하였다.

#### [0107] 실시예 6. *in vivo* 에서 OVA-특이적 면역반응의 향상을 위한 애쥬번트로서 기능하는 아스코필란의 효과

[0108] 아스코필란-OVA의 처리가 마우스에 있는 두번째 종양 형성을 막는다는 발견으로부터 아스코필란과 함께 OVA-면역화가 OVA-특이적인 항체 및 T 세포 면역반응을 촉진시킬 수 있는지를 실험하였다. C57BL/6 마우스에는 OVA 단독 또는 50 mg/kg의 아스코필란과 함께 0, 15 및 30일에 정맥(i.v.)주사하였다. 35일째에 분석을 위해 혈청 및 비장세포를 모았다. 아스코필란과 함께 OVA-면역화는 PBS 처리한 것과 비교할 때 혈청에 있는 OVA-특이적인 IgG1(immunoglobulin G1) 및 IgG2a의 양에 있어 상당한 증가를 유도한 반면, OVA 단독에 의한 면역화는 상기의 효과를 가지지 않았다(도 5A).

[0109] 35일째에는 4일 동안 OVA로 *in vitro* 에서 비장세포를 다시 자극시키고 OVA에 대항하는 T 세포 면역반응을 측정하였다. 아스코필란-OVA의 조합에 의해 면역화된 마우스로부터 유래된 비장세포는 OVA 단독으로 면역화된 마우스로부터 유래된 비장세포에 비해 상당히 증가된 세포 증식 및 IFN- $\gamma$  생산을 보였다(도 5B 및 5C). 더욱이, effector/memory T 세포의 중요한 표면 마커인 CD44의 발현량은 PBS 또는 OVA 단독으로 처리된 마우스로부터 유래된 비장 CD4 및 CD8 T 세포에 비해 아스코필란-OVA의 조합에 의해 면역화된 마우스로부터 유래된 비장 CD4 및

CD8 T 세포에서 상당히 높았음을 확인하였다(도 5D).

[0110] 따라서, 아스코필란은 항원 특이적인 B 세포의 생산 및 T 세포 면역반응을 향상시킬 수 있는 애쥬번트로서 기능한다는 것을 확인하였다.

[0112] **실시예 7. 아스코필란-OVA 면역화에 의한 B16-OVA 종양 형상 억제 효과**

[0113] 아스코필란이 OVA-특이적인 면역반응을 위한 애쥬번트로서 기능할 수 있다는 발견으로부터, 본 발명자들은 상기 면역반응이 B16-OVA 종양 세포가 이식된 마우스를 보호할 수 있는지를 확인하고자 하였다. C57BL/6 마우스는 0, 15, 30일에 PBS, OVA, 아스코필란 또는 아스코필란-OVA의 조합으로 정맥주사(*i.v.*)하여 면역화되었다. 35일째에는 B16-OVA 멜라노마 세포가 마우스의 피하(*s.c.*)로 접종되었다. 그 결과, 아스코필란-OVA 조합에 의해 면역화된 마우스는 거의 완전하게 B16-OVA 종양 형성으로부터 보호되었음을 확인하였다(도 6A 및 6B). 더욱이, 아스코필란-OVA 조합에 의하여 면역화된 마우스는 PBS, OVA 또는 아스코필란 단독으로 면역화된 마우스에 비해 현저하게 감소된 종양 성장을 보였다(도 6C).

[0114] 다음으로, 본 발명자들은 *in vivo* 세포독성 어세이에서 CTL(Cytotoxic T Lymphocytes)의 기능적 활성을 조사하였다. 초기 면역화 후 35일째에 면역화된 마우스에는 C57BL/6 공여(donor) 마우스로부터의 SIINFEKL-펩스된 및 CFSE-레이블된 비장세포로 정맥(*i.v.*)주사하였고, 유세포분석기에 의해 특이적인 세포 용해를 측정하였다. 특이적인 타겟 세포 용해는 아스코필란-OVA 조합에 의해 면역화된 마우스에서 75% 이었고, 이는 T 세포 메모리 유도를 가리킨다(도 6D). 대조적으로, OVA 또는 아스코필란 단독에 의해 면역화된 마우스는 OVA-펩스된 비장세포의 상당한 사멸을 보이지 않았다(도 6D).

[0115] 따라서, 아스코필란은 *in vivo* 에서 장기적으로 종양의 항원 특이적인 면역 반응의 형성을 촉진시키고, 종양 형성에 대항하여 마우스를 보호할 수 있음을 확인하였다.

[0117] **실시예 8. 아스코필란-OVA 면역화에 B16-OVA 흑색종 전이의 억제 효과**

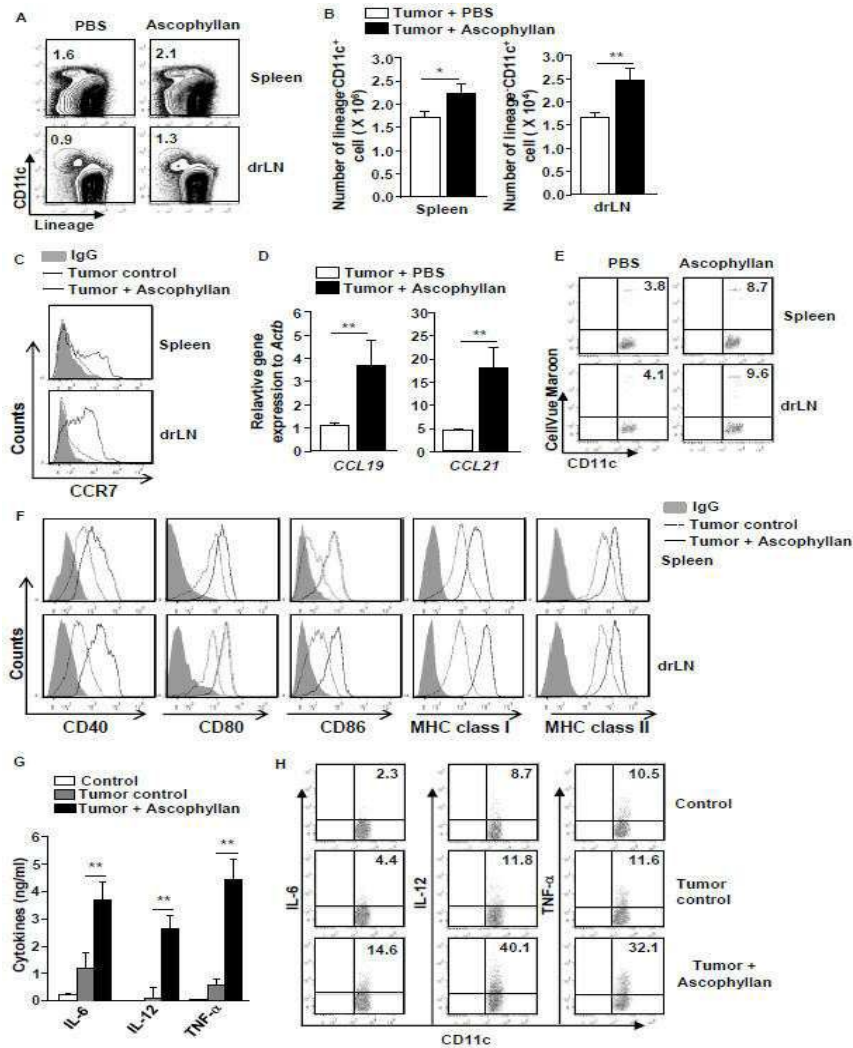
[0118] 다음으로, 본 발명자들은 아스코필란-OVA 조합에 의한 처리가 마우스에서의 종양 전이를 억제할 수 있는지를 확인하였다. 마우스에는 PBS, 50  $\mu$ g의 OVA, 50 mg/kg의 아스코필란 또는 아스코필란-OVA를 정맥(*i.v.*)주사하였고, 3일 후  $0.5 \times 10^6$  B16-OVA 흑색종 세포로 비장내(*i.s.*)로 접종하였다. 종양세포 주입 후 3일째에 마우스에는 동일한 양의 아스코필란-OVA 처리가 다시 이루어졌다.

[0119] 그 결과, PBS, OVA 또는 아스코필란 단독으로 처리되었던 마우스는 B16-OVA 세포의 접종 후 14일째부터 죽기 시작했고, 모든 마우스는 18일 내에 죽었다. 대조적으로, 아스코필란-OVA 조합으로 처리되었던 마우스는 B16-OVA 접종 후 26일 부터 죽기 시작했고, 모든 마우스는 28일 내에 죽었다(도 7A). 더욱이, B16-OVA 세포의 주입 후 10일째에 비장에서의 종양 덩어리의 크기는 OVA 또는 아스코필란 단독으로 처리된 마우스에 비해 아스코필란-OVA 조합으로 처리된 마우스에서 훨씬 작았음을 확인하였다(도 7B). 또한, 아스코필란-OVA 조합으로 처리된 마우스는 다른 실험군에 비하여 매우 낮은 정도의 종양 세포 침입 및 간으로의 전이(모든 마우스에서 관찰됨)를 보였다(도 7B 및 7C).

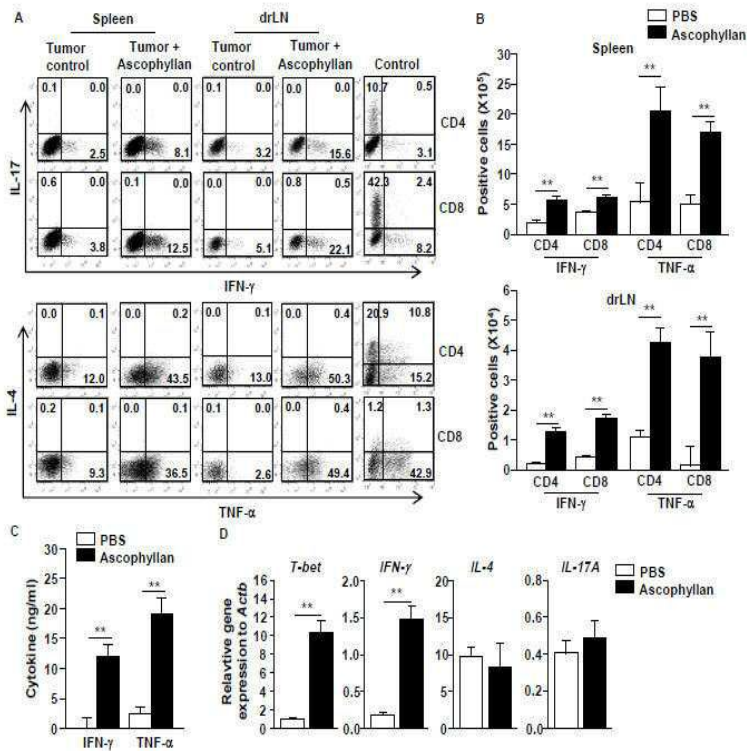
[0120] 따라서, 아스코필란-OVA 조합은 B16-OVA 흑색종 세포의 간으로의 침입 및 전이에 대하여 보호할 수 있음을 확인하였다.

도면

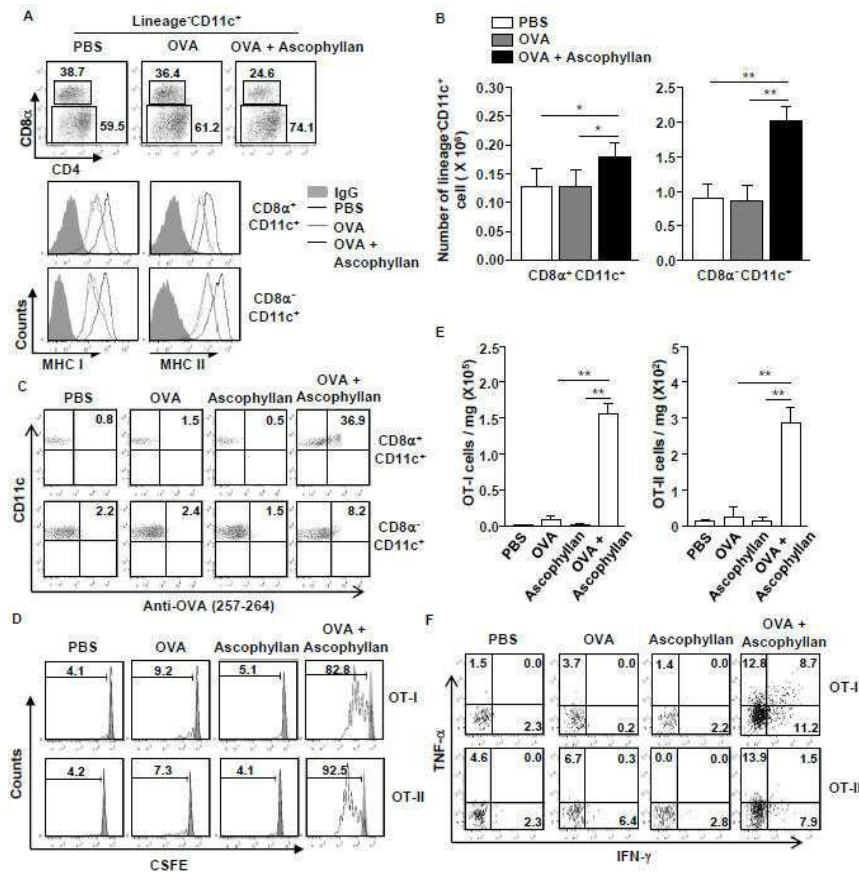
도면1



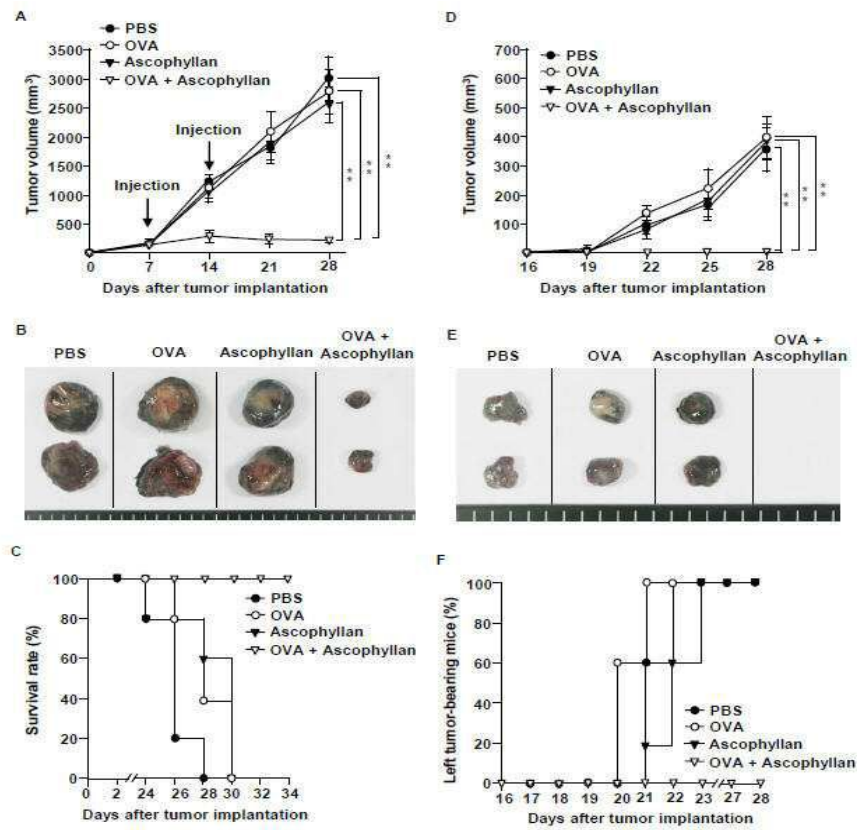
도면2



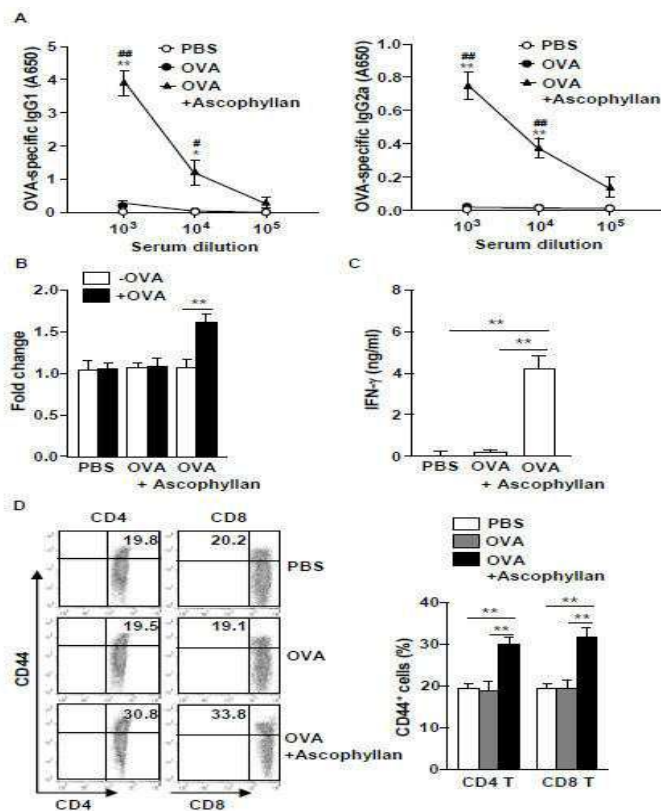
도면3



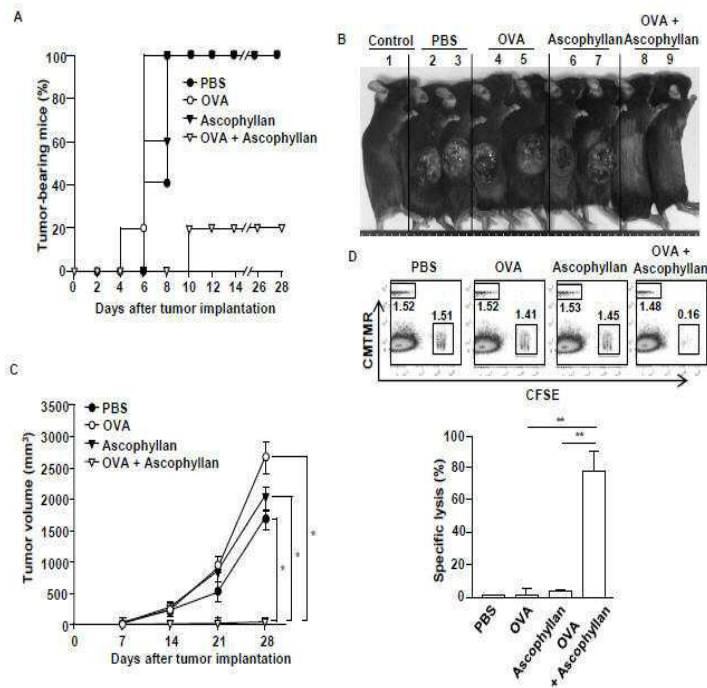
도면4



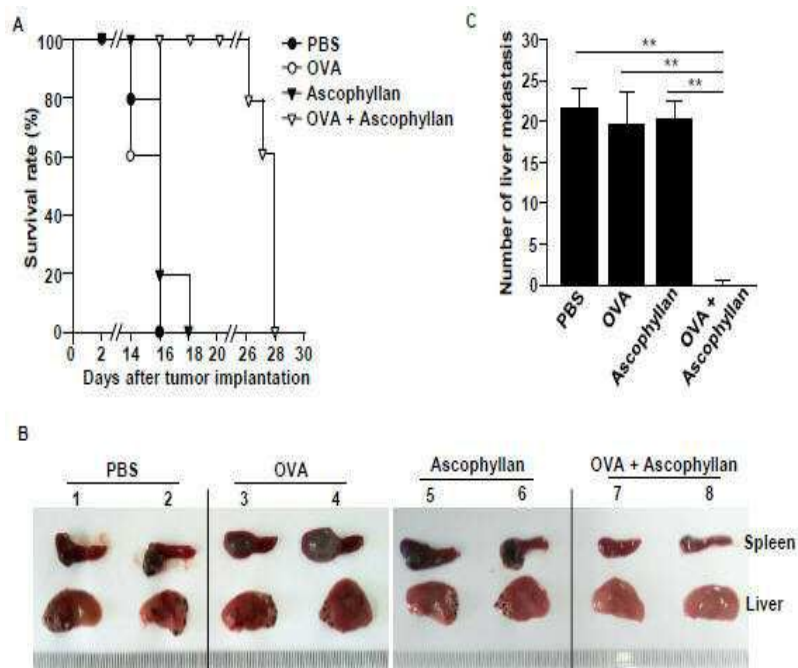
도면5



도면6



도면7



## 서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation of Pukyong University
- <120> Adjuvant composition comprising ascophyllan as active ingredient
- <130> PN1610-352

<160> 15  
 <170> KoPatentIn 3.0  
 <210> 1  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Artificial Sequence  
 <400> 1

Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu

1 5

<210> 2  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Artificial Sequence  
 <400>

> 2

tggatgacga tatcgctgcg 20

<210> 3  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Artificial Sequence  
 <400> 3

agggtcagga tacctctctt 20

<210> 4  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Artificial Sequence  
 <400> 4

ctgcctcaga ttatctgcc a t 21

<210> 5  
 <211> 20

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Artificial Sequence  
 <400> 5  
 aggtagcgggaggctttcac 20  
 <210> 6  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Artificial Sequence  
 <400> 6  
 atccccggcaa tctgtttctc 20  
 <210> 7  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Artificial Sequence  
 <400> 7  
 ggtttctgcac ccagccttc 19  
  
 <210> 8  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Artificial Sequence  
 <400> 8  
 caacaacccc ttgccaag 20  
 <210> 9  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Artificial Sequence  
 <400> 9  
 tcccccaagc attgacagt 19  
 <210> 10

<211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Artificial Sequence  
 <  
 400> 10  
 ggatgcattc atgagtattg c 21  
 <210> 11  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Artificial Sequence  
 <400> 11  
 cttttccgct tcctgagg 18  
 <210> 12  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Artificial Sequence  
 <400> 12  
 acaggagaag ggacgccat 19  
 <210> 13  
 <  
 211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Artificial Sequence  
 <400> 13  
 gaagccctac agacgagctc a 21  
 <210> 14  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Artificial Sequence  
 <400> 14

gcgcaaaagt gagtccaga

20

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 15

acagagggat atctatcagg g

21