



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2007년12월10일
(11) 등록번호 10-0784170
(24) 등록일자 2007년12월04일

(51) Int. Cl.

A61K 38/16 (2006.01) *A61K 38/20* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-0098289

(22) 출원일자 2006년10월10일

심사청구일자 2006년10월10일

(56) 선행기술조사문헌

US6562334 B1

Nature genetics 제36권, 제8호, 제837-841면, 2004년.

Cancer Res. 제66권, 제8호, 제4461-4467면, 2006년4월15일.

전체 청구항 수 : 총 3 항

(73) 특허권자

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자

전태훈

서울시 송파구 방이동 89 올림피아아파트 236동 1802호

김은미

경기도 군포시 산본1동 246번지 306호

(74) 대리인

양부현, 윤여강, 이문섭

심사관 : 김윤경

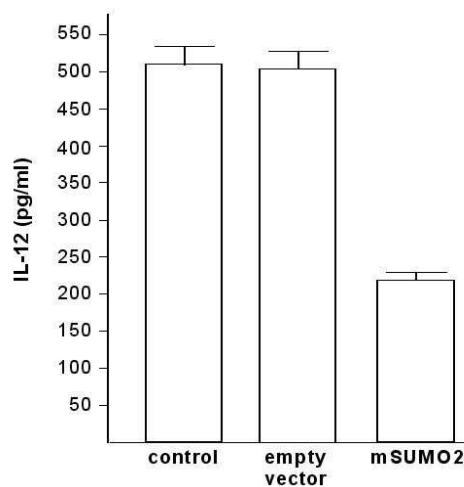
(54) SUMO 유전자를 이용한 인터루킨-12의 생산 및 분비억제용 조성물

(57) 요약

본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 SUMO 유전자 또는 그 발현 단백질을 유효성분으로 함유하는 인터루킨-12 생산 및 분비 억제용 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, SUMO 유전자를 이용하여 Th1 사이토카인 또는 proinflammatory 사이토카인인 인터루킨-12의 생산과 분비를 억제함으로써, 자가면역질환 또는 이식거부에서 발생하는 면역 활성을 억제할 수 있다.

대표도 - 도4



특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 스모(SUMO: Small Ubiquitin Like Modifier) 유전자 또는 그 발현 단백질 유효성분으로 함유하는 자가면역질환 또는 이식거부 치료용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 스모(SUMO: Small Ubiquitin Like Modifier) 유전자는 발현벡터에 삽입되어 있는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 발현벡터는 도 6b의 개열지도를 갖는 mSUMO2/PLNCX2인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

삭제

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <7> 본 발명은 SUMO 유전자를 포함하는 인터루킨-12의 생산 및 분비 억제용 조성물에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 SUMO 유전자 또는 그 발현 단백질을 유효성분으로 함유하는 인터루킨-12 생산 및 분비 억제용 조성물에 관한 것이다.
- <8> 본 발명은 유비퀴틴-유사 단백질 중 마우스의 SUMO2가 IL-12의 전사량과 방출량을 저해한다는 것이다. 유비퀴틴-유사 단백질 중에서 SUMO (small ubiquitin like modifier)는 유비퀴틴과 유사하게 E1, E2 및 E3 효소들에 의해 카르복시 말단의 글라이신과 표적 단백질 내의 라이신 (Lys)사이 에 펩티드 결합을 형성함으로써 여러 단백질과 결합되는데 이를 SUMO화 (sumoylation)라고 한다 (Tatham et al., 2001). SUMO 단백질은 효모에서 인간에 이르기까지 진화적으로 잘 보존되어 있다. 출아형 효모 (Saccharomyces cerevisiae)의 SUMO 유사체인 Smt3는 SUMO 가족중 가장 먼저 보고된 사례로서 동원체 관련 단백질인 MIF2 유전자 돌연변이의 억제인자로 발견되었다 (Meluh and Koshland, 1995). SUMO는 면역항원미경을 통해 확인된 것처럼 주로 핵 안이나 핵막에 위치한다. SUMO의 핵 내에서의 기능은 다양하지만 주로 DNA 회복, 복제, 전사에 영향을 주는 것으로 알려져 있고, 그 밖에 RNA 관련과정, 세포주기조절, 대사과정, 단백질변역과 폴딩등에도 관계됨을 알 수 있다 (Denison et al., 2005).
- <9> 포유동물에서 알려진 스모기질단백질의 절반이상이 전사과정에 필요한 공동활성인자 (co-activator) 또는 공동억제인자 (co-repressors) 또는 전사조절인자 자체에 해당한다. 대표적인 예로는 HSF1/2, CREB, ELK-1, Sp3, IRF-1, AP-2, Lef1, GRIP1, p300 그리고 CtBP1을 들 수 있다 (Girdwood et al., 2004). 따라서 SUMO 기능을 이용하여 인간 질병의 유용한 치료법으로 이용하고자 하는 움직임이 일어나고 있다. 대표적인 예로 인간 세포주 및 동물 실험을 이용하여 새로운 암 치료 기법의 개발 등을 들 수 있다. 그러나 SUMO의 기능이 면역계에 어떠한 영향을 나타내는지에 대한 연구는 아직 알려져 있지 않다. 따라서 본 발명은 최초로 SUMO 단백질의 과발현이 수지상세포의 IL-12 분비를 억제 한다는 것을 처음으로 보고한다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- <10> 따라서, 본 발명의 주된 목적은 SUMO 유전자의 새로운 용도를 밝히고, IL-12 생산 및 분비 억제기능을 갖는 SUMO 유전자를 이용한 인터루킨-12의 생산 및 분비 억제용 조성물을 제공하는 데 있다.

발명의 구성 및 작용

- <11> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 SUMO 유전자 또는 그 발현 단백질질을 유효성분으로 함유하는 인터루킨-12 생산 및 분비 억제용 조성물을 제공한다.
- <12> 본 발명의 조성물에서, 바람직하게는 상기 SUMO 유전자는 발현벡터에 삽입되어 있는 것을 특징으로 한다. 또한, 상기 발현벡터는 상기 SUMO 유전자를 동물세포에서 발현할 수 있는 어떤 발현벡터도 가능하나, 예컨대 pJM17 (Microbix 사 제품, 캐나다) 같은 아데노바이러스 벡터 또는 pLNCX2 (CLONTECH)와 같은 레트로바이러스 벡터 또는 pAAVCMV와 같은 아데노부속바이러스 벡터가 바람직하며, 도 6b의 개열지도로 갖는 레트로바이러스 발현벡터 mSUMO2/pLNCX2인 것을 특징으로 하는 것이 더욱 바람직하다. 또한, 상기 발현벡터는 상기 발현벡터를 패키징 세포에서 증식하여 얻은 레트로바이러스 클론의 형태일 수도 있다.
- <13> 본 발명의 조성물에서, 상기 SUMO 유전자 및 그 발현 단백질은 자가면역질환 (autoimmune disease) 또는 이식 거부 (graft rejection)에서 발생하는 면역 활성을 억제하는 것을 특징으로 하는 조성물인 것이 바람직하다. 본 발명에서의 면역 활성 억제는 자가면역질환을 일으키고 이식거부에서 염증반응을 촉진하는 사이토카인인 인터루킨-12에 의해 매개되는 면역활성을 억제하는 것을 말한다.
- <14> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산을 코딩하는 SUMO 유전자를 숙주세포에 과발현 시켜서 면역활성을 억제하는 방법을 제공한다.
- <15> 본 발명의 면역활성을 억제하는 방법에서, 상기 숙주세포는 SUMO 유전자를 포함하는 벡터로 형질전환 되거나 기존 SUMO 유전자의 전사를 당업계에 공지된 방법으로 up-regulate하는 방법인 것이 바람직하다.
- <16> 본 발명의 조성물에서, 상기 조성물은 본 발명의 유효성분인 SUMO 유전자를 포함하는 바이러스 클론 또는 그 발현 단백질 외에 생물체제에 통상 사용되는 안정화제 및 담체, 보조 활성성분 등을 더 포함할 수 있으며, 면역활성 억제를 위해 주사제 형태로 인체에 투여될 수 있다. 이 때 환자에게 투여될 바이러스 클론 입자의 적정 수는 환자의 중한 상태에 따라 다르나 바람직하게는 체중 kg당 100 ~ 2000 MOI 정도이고, 발현 단백질의 경우는 성인 기준 일당 100 μ g ~ 1000 mg 정도이다.
- <17> 본 발명에서는 다음과 같은 구성으로 생쥐의 SUMO2 유전자 분리 및 생쥐 수지상세포의 IL-12 생산과 분비를 억제하는 실험을 수행하였다.
- <18> 1. RT-PCR 방법에 의한 생쥐의 SUMO2 유전자의 클로닝
- <19> 2. 유전자의 염기서열과 아미노산 서열 확인
- <20> 3. 단백질 발현 플라스미드 제조 및 단백질 발현
- <21> 4. 생쥐 수지상세포의 IL-12 생산과 분비 측정
- <22> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.
- <23> 실시예 1. RT-PCR 방법에 의한 유전자의 클로닝
- <24> 생쥐 B 세포 (A20; ATCC; catalogue no.:TIB-208)에서, 트리졸 (Trizol, Invitrogen) 1 ml당 200 μ l의 chloroform (Sigma)을 넣고 전체 RNA를 분리 하였고 추출한 2 μ g의 mRNA를 주형으로 역전사 연쇄증합반응에 의해 cDNA를 복제한 후, 이들 cDNA를 주형으로 하고, 유전자 database에서 얻은 유사한 유전자 염기 서열에 따라 서열번호 3 및 4와 같이 프라이머를 제작한 다음 연쇄증합반응을 통해 288bp에 달하는 서열번호 1의 생쥐 SUMO2 유전자를 획득하였다. 여기서, 역전사 효소는 Superscript III (Invitrogen)를 사용하였으며, 증합효소는 Taq polymerase (Gene craft)를 사용하였다. 또한, 사용한 프라이머는 1개의 정방향 상용 프라이머 (Cosmo) 역방향 상용 프라이머 1개이다.
- <25> 정방향 프라이머 (서열번호 3)
- <26> 5'-TGA AGC GGC AGC TGA GGA GAC T-3'
- <27> 역방향 프라이머 (서열번호 4)
- <28> 5'-GAC CAT CTC CAT CTC ATG TCA ACC-3'
- <29> 이상과 같이 연쇄 증합반응으로 얻은 생쥐 SUMO2 유전자는 pGEM-T easy 벡터(promega)에 클로닝 하였다.

- <30> 실시예 2. 염기서열과 아미노산 서열 확인
- <31> 상기 실시예 1에서 찾아낸 유전자의 염기서열은 자동 DNA서열 분석기(Applied Biosystem 373A)를 사용하여 디테 옥시 방법으로 DNA 염기서열을 결정하였다. 이 때 모든 서열은 유전자의 양쪽 방향으로 분석되었으며, 모든 제한효소의 위치도 확인되었다.
- <32> 이 유전자 서열을 생쥐 유전자 database에서 blast search하여 비교하였을 때 본 발명에서 찾아낸 유전자가 생쥐 SUMO2 유전자임을 확인할 수 있었으며 (GenBank access number: NM_133354), 시작 코돈으로부터 종료코돈까지 288개의 염기쌍으로 이루어져 있었다.
- <33> 상기 유전자에 의해 발현되는 효소 단백질은 95개의 아미노산으로 구성되고, 단백질의 분자량은 약 11 킬로달톤이었으며, 이 단백질을 생쥐 SUMO2로 명명하였다.
- <34> 실시예 3. 단백질 발현 플라스미드 제조, 단백질 발현
- <35> 생쥐 SUMO2 유전자로부터 단백질을 발현시키기 위해서 생쥐 SUMO2 유전자를 포유류의 발현벡터인 pLNCX2 (CLONTECH)에 클로닝하였다. 먼저 실시예 1에서 밝힌 primer (서열번호 3, 4)로 RT-PCR을 이용하여 생쥐 SUMO2 유전자 full cDNA sequence (서열번호 1)를 얻은 후, TA cloning에 의해 pGEM-T easy 벡터(promega)에 클로닝하였다 (도 5a, b). 이렇게 얻은 클로닝한 생쥐 SUMO2 유전자를 제한효소 NotI 을 사용하여 절단하고 T4 ligase (Invitrogen)로 pLNCX2의 제한효소 부위인 NotI에 ligation시켜 생쥐 SUMO2 유전자를 발현하는 재조합벡터를 완성하였다 (도 6a, b). 그 후, 염기서열 분석을 이용하여 생쥐 SUMO2 cDNA의 발현 방향이 맞는지 확인하였다. 그리고 각각 Tetracycline off system의 293GPG 세포와 생쥐 유래 세포인 수지상세포를 사용하여 형질전환 시켰다.
- <36> 293GPG 세포 (Braas et al., 1996, Bioseparation 6(4):211-228)를 6-well 조직 배양 플레이트에 well당 1×10^5 세포가 되도록 접종하고 10 % 송아지 혈청을 함유한 DMEM 배지에서 배양하였다. 세포가 24시간 후 well 표면의 70 ~ 80 % 정도를 덮을 정도로 자라면, 무혈청 DMEM 배지에서 1 ~ 2 μ g의 생쥐 SUMO2 발현 벡터 DNA를 6 ~ 8 μ l의 LIPOFECTAMINE PLUS (Invitrogen)를 사용하여 감염시켰다. 감염시킨 293GPG 세포를 24시간 배양하여 얻은 virus (Retro virus)를 포함하는 배양상청액을 이용하여 숙주세포 (생쥐 수지상 세포)를 4 ~ 5시간 배양 후 혈청이 10 % 함유된 배지로 바뀌서 24시간 배양하였으며 이 과정을 3회 반복하였다. 숙주세포로 사용된 생쥐 수지상 세포는 생쥐의 골수세포에서 유래하였으며 5 ng/1 ml 의 IL-4 와 1 ng/1 ml 의 GM-CSF를 넣어 일주일 배양한 후 미성숙 수지상 세포로 유도하였으며 1 μ g/1 ml의 LPS를 넣어 일주일 배양하여 성숙한 수지상 세포로의 분화를 유도하였다. 293GPG 세포를 24시간 배양하여 얻은 virus를 포함하는 배양 상청액은 성숙한 수지상 세포로 분화 유도시에 LPS와 동시에 첨가하였고, 4 ~ 5시간 후에도 LPS는 지속적으로 첨가하였다. 대조군으로는 생쥐 SUMO2 유전자가 들어가지 않는 벡터만을 사용하였다.
- <37> 형질전환 시킨 수지상세포에서 SUMO2의 과발현을 확인하고자 Western blot analysis와 형광현미경을 이용한 관찰을 하였다. 우선 수지상세포를 SDS-세포추출용액으로 단백질을 추출하여 전기영동 후 SUMO2에 대한 항체를 사용하여 Western blot을 시행하였다. Western blot analysis 결과 약 11 킬로 달톤의 SUMO 단백질이 anti-mouse SUMO2 항체에 의해서 발견되었다 (도 1 참조). 또한 SUMO2의 세포 내 발현을 확인하기 위해 anti-mouse SUMO2 항체에 PE라는 형광물질을 달아서 형광현미경하에서 SUMO2가 세포내 핵 내에서 발현하는 것을 검증하였다. 이때 핵을 알아보기 위해 DAPI staining을 하였다. 그 결과 DAPI staining과 SUMO2가 merge후 겹치는 것으로 보아 SUMO2가 핵 내에서 과발현함을 확인하였다 (도 2 참조).
- <38> 실시예 4. 생쥐 수지상세포의 IL-12 생산과 분비 측정
- <39> 미성숙 수지상세포에서 성숙 수지상 세포로 분화하는 동안에 생쥐 SUMO2 유전자가 수지상세포의 분화에 어떻게 영향을 미치는지를 보기 위해 성숙한 수지상 세포에서 발현되는 IL-12의 양을 RT-PCR과 ELISA assay를 이용하여 확인하였다.
- <40> 우선 IL-12의 분비량을 mRNA 수준에서 관찰하기 위해 RT-PCR을 수행하였다. 수행방법은 실시예 1과 동일한 방법으로 성숙한 수지상 세포에서 RNA를 분리하였고 cDNA를 복제하였으며 IL-12의 Primer (서열번호 5, 6)를 사용하여 분비되는 양을 확인하였다 (도 3 참조). 그리고, 사용한 프라이머는 1개의 정방향 상용 프라이머 (Cosmo) 역방향 상용 프라이머 1개이다.
- <41> 정방향 프라이머 (서열번호 5)

<42> 5'-CTG CCA CAA AGG AGG CGA GAC TC-3'

<43> 역방향 프라이머 (서열번호 6)

<44> 5'-CAT ATT TAT TCT GCT GCC GTG CTT C-3'

<45> 또한 성숙한 수지상 세포에서 얻은 무혈청 배지의 상청액을 가지고 ELISA를 수행한 결과 생쥐의 SUMO2 유전자 발현 벡터가 들어간 성숙한 수지상 세포에서 분비되는 IL-12의 양이 대조군에서 분비되는 IL-12의 양보다 크게 감소하는 것을 확인하였다 (도 4 참조). 그 결과 상기 RT-PCR 결과와 유사하게 ELISA assay에서도 IL-12의 분비되는 양이 대조군에 비해 크게 감소함을 확인하였다.

발명의 효과

<46> 이상 설명한 바와 같이, 본 발명은 SUMO2 유전자가 생쥐 수지상세포의 IL-12 생산과 분비를 억제하는 것을 증명하였다. SUMO2 유전자에 의한 유전자 치료를 통하여 Th1 cytokine 또는 proinflammatory cytokine인 인터루킨-12의 생산과 분비를 억제함으로써, 자가면역질환 (autoimmune disease) 또는 이식거부 (graft rejection)에서 발생하는 면역 활성을 억제할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 본 발명에 따른 수지상 세포에서 생쥐 SUMO2 유전자의 과발현을 나타낸다.

<2> 도 2는 본 발명에 따른 수지상 세포 핵 내의 생쥐 SUMO2 유전자의 과발현을 나타낸다.

<3> 도 3은 본 발명에 따른 SUMO 유전자가 과발현된 수지상 세포에서의 IL-12 전사량 발현 감소를 나타낸다.

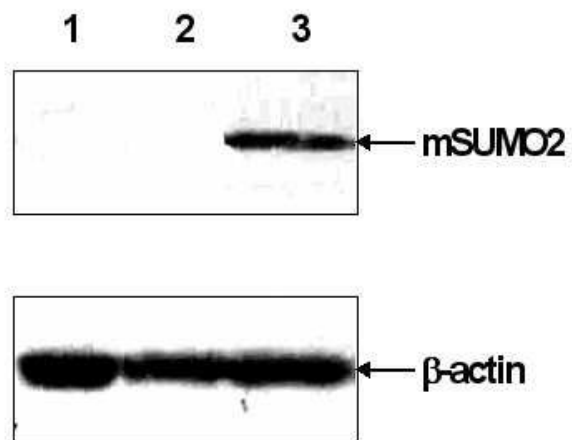
<4> 도 4는 본 발명에 따른 SUMO 유전자가 과발현된 수지상 세포에서의 IL-12 방출량 감소를 나타낸다.

<5> 도 5는 본 발명에 따른 SUMO 유전자를 포함하는 클로닝 벡터를 만들기 전 pGEM-T easy 벡터 (a)와 만든 후의 mSUMO2/T-easy 재조합 벡터 (b)를 각각 나타낸다.

<6> 도 6은 본 발명에 따른 SUMO 유전자를 발현하는 재조합 벡터를 만들기 전 pLNCX2 벡터 (a)와 만든 후 mSUMO2/pLNCX2 재조합벡터 (b)를 각각 나타낸다.

도면

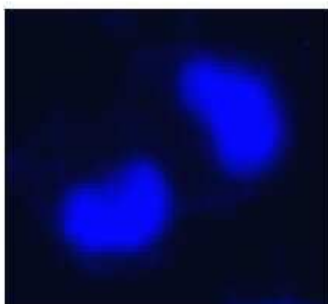
도면1



1. Mature dendritic cell
2. pLNCX2 (empty vector) / Dendritic cell
3. mSUMO2 / pLNCX2 / Dendritic cell

도면2

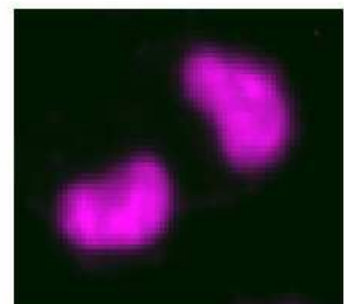
DAPI staining



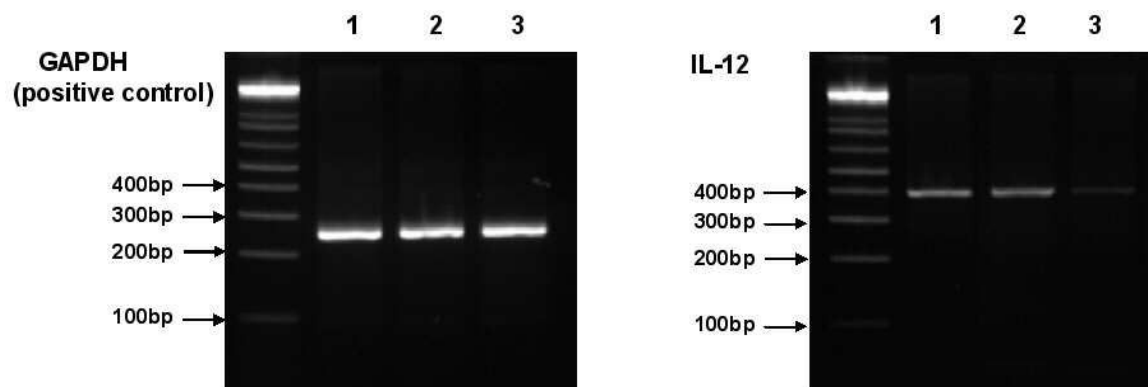
mSUMO2



merge

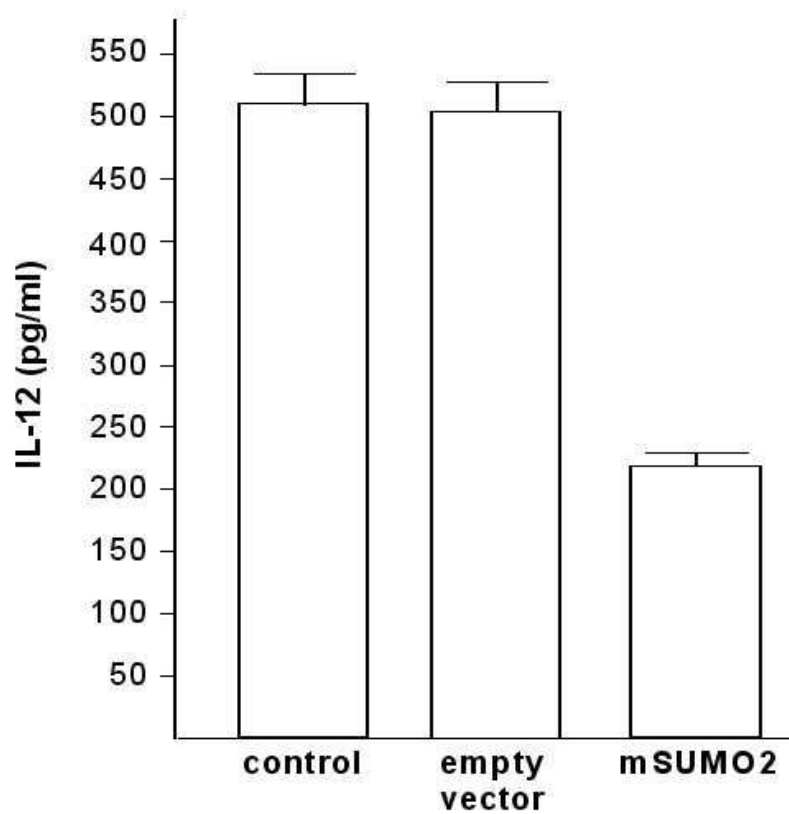


도면3

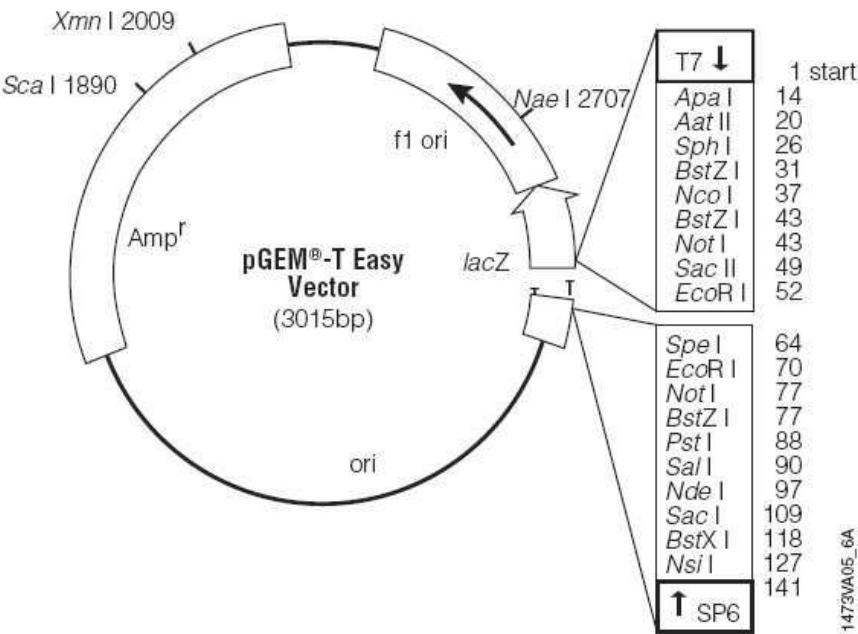


1. Mature dendritic cell
2. pLNCX2 (empty vector) / Dendritic cell
3. mSUMO2 / pLNCX2 / Dendritic cell

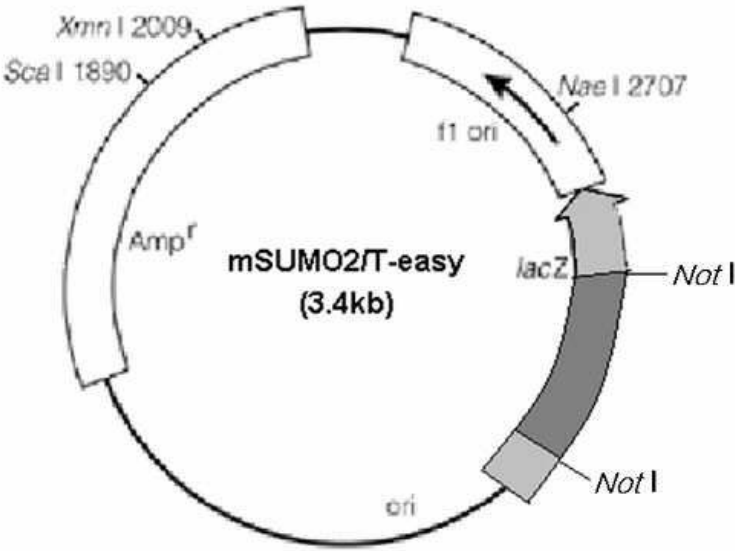
도면4



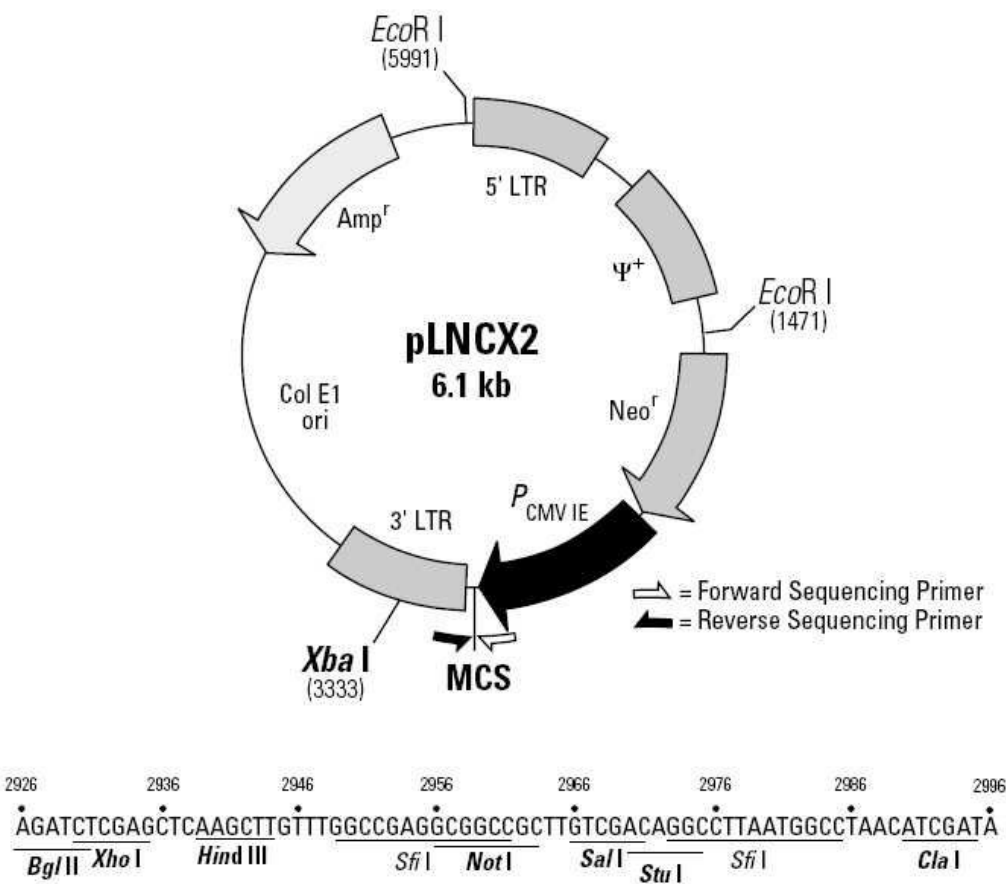
도면5a



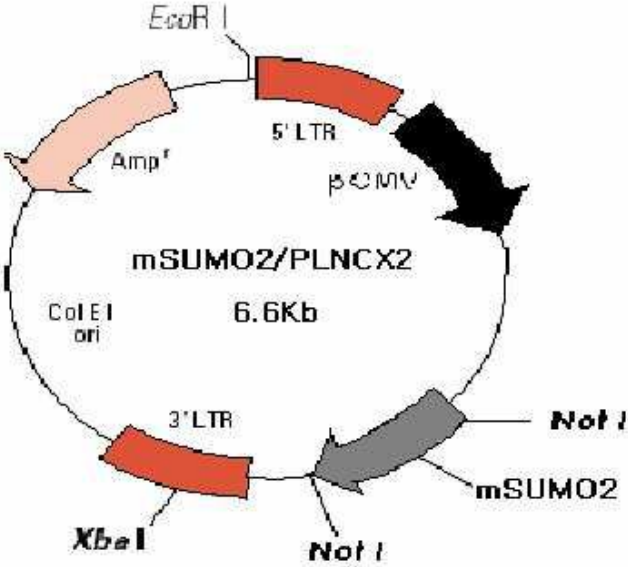
도면5b



도면6a



도면6b



서열목록 전자파일 첨부