



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0098110
(43) 공개일자 2013년09월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/17 (2006.01) A61K 38/16 (2006.01)

A61K 35/64 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0059896

(22) 출원일자 2012년06월04일

심사청구일자 2012년06월04일

(30) 우선권주장

1020120019925 2012년02월27일 대한민국(KR)

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)

(72) 발명자

배현수

서울특별시 서초구 잠원동 76번지 한신시티21오피스텔 218호

이효정

인천광역시 서구 마전동 검단2차 아이파크아파트 204동 1202호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

손민

전체 청구항 수 : 총 10 항

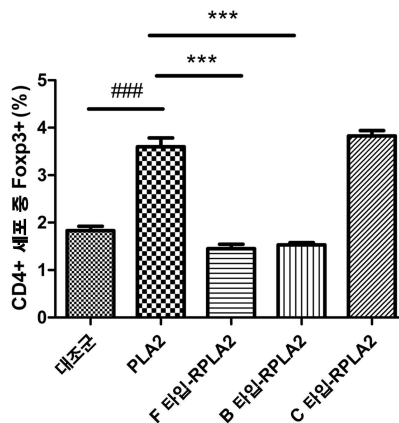
(54) 발명의 명칭 봉독-P L A2를 포함하는 이상 조절 T 세포 활성 저하 관련 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 리더서열이 제외된 봉독-PLA2(bee venom-phospholipase A2; BV-PLA2) 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 유효성분으로 포함하는 이상 조절 T 세포 활성 저하 관련 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 분비형 봉독 유래 포스포리파아제 A2(bee venom-phospholipase A2; 분비형 BV-PLA2)는 조절 T 세포를 활성화하는 한편, Th1/Th17 분화를 억제할 수 있다. 따라서, 본 발명의 폴리펩티드는 이상인 조절 T 세포 활성 저하 관련 질환 즉, 자가면역성 질환, 알레르기성 질환 또는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도23



(72) 발명자

이기현

서울시 동대문구 이문동 264-299

김현성

부산광역시 해운대구 반여동 1291-907

박수진

대구광역시 동구 신암4동 258-1

정은숙

경기도 용인시 기흥구 공세동 대주피오레아파트
104동 802호

최태원

서울시 중구 광희동2가 161

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20100027289

부처명 교육과학기술부

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 Foxp3 유전자 발현 조작기술을 이용한 Foxp3 기능연구 및 면역질환 치료 기술 개발

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2010.09.01 ~ 2013.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

리더서열이 제외된 봉독-PLA2 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 유효성분으로 포함하는 이상 조절 T 세포 활성 저하 관련 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 리더서열이 제외된 봉독-PLA2 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 것인 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 리더서열이 제외된 봉독-PLA2 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드는, 리더서열이 제외된 봉독-PLA2 아미노산 서열의 N-말단부위에 추가적으로 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드, C-말단부위에 추가적으로 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드 또는 둘 모두를 갖는 폴리펩티드인 것인 약학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 리더서열이 제외된 봉독-PLA2 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드는 서열번호 6의 아미노산 서열을 갖는 것인 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 리더서열이 제외된 봉독-PLA2 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드는 10내지 18 kDa의 분자량을 갖는 것인 약학적 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 이상 조절 T 세포 활성 저하 관련 질환은 알레르기성 질환, 자가면역성 질환 및 신경퇴행성 질환으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인 약학적 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 자가면역성 질환은 류머티스성 관절염, 전신성 경피증, 췌장세포 항체에 의한 인슐린 의존성 소아기 당뇨병, 원형탈모증, 건선, 천포창, 천식, 아프타구내염, 만성 갑상선염, 일부 후천성 체생불량성 빈혈, 일차성 간경변, 궤양성 대장염, 베체씨병, 크론씨병, 실리코시스, 아스베스토시스, IgA 신장질환, 연쇄상구균 감염 후 사

구체신염, 쇼그렌증후군, 길리안-바레증후군, 피부근염, 다발성 근염, 다발성 경화증, 자가면역성 용혈성 빈혈, 자가면역성 뇌척수염, 중증 근무력증, 그레이브씨 갑상선 항진증, 결절성 다발성 동맥염, 강직성 척추염, 섬유조직염, 측두동맥염, 윌슨병, 판코니증후군, 다발성 골수종 및 전신성 홍반성 루푸스로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인 약학적 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 알레르기성 질환은 천식, 아토피 피부염, 결막염, 비염 및 궤양성 대장염으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인 약학적 조성물.

청구항 9

제6항에 있어서,

상기 신경퇴행성 질환은 파킨슨병(Parkinson's disease; PD), 알츠하이머병(Alzheimer's disease; AD), 루게릭병(amyotrophic lateral sclerosis; ALS), 헌팅턴병(Huntington's disease; HD), 전측두엽 치매(Fronto-Temporal Dementia), 피질-기저핵 퇴행증(Cortico Basal Degeneration), 및 진행성 핵상마비(progressive supranuclear palsy; PSP)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인 약학적 조성물.

청구항 10

리더서열이 제외된 봉독-PLA2 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 유효성분으로 포함하는 조절 T 세포 활성화 화제.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 봉독-PLA2(bee venom-phospholipase A2; BV-PLA2)를 유효성분으로 포함하는 이상 조절 T 세포 활성화 저하 관련 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 모든 정상 개체에 있어서 가장 중요한 특성 중 하나는 자기(self)를 구성하고 있는 항원물질에 대해서는 해롭게 반응하지 않는 반면, 많은 비자기(non-self)항원에 대해서는 이를 인식하고 반응하여 제거할 수 있는 능력을 가지고 있다는 것이다. 이처럼 자기항원에 대한 생체의 무반응을 면역학적 무반응성(immunologic unresponsiveness) 또는 관용(tolerance)이라 한다. 자기관용은 자기항원의 특이적인 수용체를 가지고 있을지 모르는 림프구를 제거함으로써, 또는 자기항원에 접한 후 스스로 반응하는 기능이 불활성화됨으로써 발생한다. 자기관용을 유도하거나 계속 유지하는데 있어서 문제가 생기게 되면 자기항원에 대하여 면역반응이 일어나게 되고, 이로 인하여 초래되는 질환을 자가면역질환(autoimmune disease)이라 한다.

[0003] 다발성 경화증(multiple sclerosis; MS)은 전 세계적으로 백만명 이상이 앓고 있는 중추신경계의 만성적 염증성 자가면역질환이다. MS는 감각 및 운동, 자율 및 신경-인지 기능의 결핍으로 인한 실질적 장애를 야기한다. 질환의 발병기전은 일반적으로 $CD4^+$ T 헬퍼 1 세포(Th1: IFN- γ 생산 $CD4^+$ T 세포), T 헬퍼 17 세포(Th17: IL-17A 생산 $CD4^+$ T 세포) 및 조절 T 세포(Treg)가 중요한 역할을 하는 자가면역 병리학으로 여겨진다. 인간 MS의 동물 모델인 실험적 자가면역성 뇌척수염(experimental autoimmune encephalomyelitis; EAE)의 많은 임상적 및 병리학적 특성은 MS와 근접한 유사성을 보인다. 따라서, EAE는 보편적으로 MS의 발병기전 메커니즘 연구 및 MS에 대

한 잠재적 치료제의 효율을 시험하기 위한 실험모델계로 사용되어왔다. IFN- β 및 아세트산 글라티라머(glatiramer acetate) 등의 질환-조절 치료제가 지난 10여년 넘게 MS 치료에 널리 적용되고 있으며 유익한 효과를 보이고 있다. 그러나, 기존의 치료방법의 한계로 인해 많은 MS 환자들이 선택적 대체 치료법을 찾고 있다. 50 내지 75%의 MS 환자는 하나 또는 그 이상의 보완대체의학적 치료법(complementary and alternative medicinal therapies)을 사용하고 있다.

[0004] 알레르기성 질환(allergic disease)은 면역체계의 이상으로 보통 사람에게는 무해한 물질이 특정인에게만 다양한 증상의 과민반응을 일으키는 질환을 의미한다. 상기 알레르기성 질환을 일으키는 물질은 알레르겐(allergen) 또는 항원이라고 하며, 꽃가루, 항생제, 약물, 먼지, 음식, 찬공기나 햇빛 등도 알레르기를 유발하는 원인이 될 수 있다. 상기 알레르기성 질환의 증상으로는 두드러기, 재채기, 가려움증, 콧물, 기침, 건초열, 충혈안, 습진, 발진 등이 있다. 대표적인 알레르기성 질환으로는 기도협착, 폐점액분비 증가, 호흡곤란, 기침 등의 증상을 동반하는 알레르기성 천식이 있으며, 이외에 아토피 피부염, 결막염, 비염, 및 췌양성 대장염 등이 있다.

[0005] 신경퇴행성 질환(neurodegenerative diseases)은 신경세포가 퇴화하고, 기능을 잃고, 그리고 종종 사멸하는 경우의 증상들과 관련된다. 이들은 주로 진행성이기 때문에, 신경퇴행성 질환의 결과는 종종 대단히 파괴적이다. 신경퇴행성 질환을 가진 환자들은 인지(cognitive) 또는 운동(motor) 능력에 있어서의 극심한 퇴화를 겪을 수 있다. 결과적으로, 그들의 삶의 질 및 삶에 대한 기대는 현저히 감소될 수 있다.

[0006] 파킨슨병(Parkinson's disease; PD)은 대표적인 신경퇴행성 질환으로 흑색질(substantia nigra; SN)에서 도파민성(dopaminergic; DA) 뉴런의 상실 및 선조체(striatum; STR)에서의 도파민 감소로 인한 떨림, 경직, 느린 동작, 및 운동완만증을 특징으로하는 진행성 신경퇴행질환이다. PD는 발병기전이 알려지지 않은 산발성 질환이지만, 현재까지 축적된 증거에 의하면 신경염증이 PD의 발병기전에서 중요한 역할을 하는 것으로 판단된다. 신경염증의 일차 매개체는 활성화된 미세아교세포이다. 이는 퇴행하는 DA 뉴런에서 및 주위에서 발견되는 중추신경계(central nervous system; CNS)의 선천적인 면역세포이다. 미세아교세포는 신경 손상에 반응하여 극적으로 활성화되고, ROS 및/또는 염증촉진(proinflammatory) 사이토카인을 포함하는 여러가지의 잠재적인 신경독성물질을 생성한다. 현재까지 양자면역계(adoptive immune system)의 역할은 PD 발병기전에서 점점 더 중요성이 증가하고 있다. 이같은 파킨슨병의 치료를 위한 약물로서, 엘도파(L-dopa) 제제, 도파민 수용체 작용제, 항콜린 약제, 엘덤프릴(Eldepryl=deprenyl) 등이 알려져 있으며, 이들 약물들 대부분은 원인적인 치료가 아니라 증상을 조절하는 역할을 하는 것이며, 따라서 꾸준히 지속적인 약물의 복용을 필요로 한다. 그러나, 이러한 약물들의 장기 투여는 약물 부작용의 문제점을 야기하게 된다. 예를 들어, 항콜린 약제들은 자율신경계 이상이나 정신기능의 이상 등이 나타날 수 있어 고령의 환자들에게 지속적으로 투여하는 것에 한계가 있다. 또한, 엘도파 제제의 경우 장기간 동안의 복용에 따라 점차적으로 효과가 떨어지고, 몸이 뒤틀리고 손이나 발이 저절로 움직이는 이상운동이 생기는 등의 부작용이 발생할 수 있다. 따라서, 이러한 부작용을 방지하기 위하여, 천연물로부터 유래한 파킨슨병의 치료제를 개발하려는 노력이 활발히 진행되고 있다. 황금(Scutellariae Radix) 추출물(특허공개 제2001-0081188호), 백강잠 101A(Beauveria Bassiana 101A)의 추출물(특허공개 제2004-0012396호), 복숭아 잎 추출물(특허공개 제2010-0060949호) 등을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물이 개시되었다. 그러나, 이들 천연물로부터 유래된 성분은 부작용이 없는 대신 파킨슨병의 치료효율이 낮다는 단점이 있었다.

[0007] 1970년 대 초 Gershon에 의해 고식적 T 세포(conventional T cells)의 효과기 기능(effector function)을 제어 및 억제할 수 있는 T 세포의 존재 가능성이 억제 T 세포라는 개념을 도입하여, 처음으로 제시된 이래(R. K. Gershon and K. Kondo, Immunology, 1970, 18: 723-37), 면역학의 많은 분야에서 조절 T 세포의 생물학적 특성 및 기능을 규명하기 위한 연구가 이루어져 왔다.

[0008] 특히, 1995년 Sakaguchi에 의해 CD25가 자연 발생 CD4⁺ 조절 T 세포의 중요한 표현형 마커로서 작용할 수 있음이 제시된 이래(S. Sakaguchi *et al.*, J. Immunol., 1995, 155: 1151-1164), 자가 항원(self antigen)에 대한 말초 관용(peripheral tolerance)의 유도에 있어 조절 T 세포가 갖는 역할과 중요성에 대한 연구가 중심적으로 수행되었다.

[0009] 봉독은 몇몇 면역-관련 질환 특히 류머티스 관절염의 치료에 널리 사용되고 있는 대체의학이다. 기존의 연구들은 봉독치료가 인간 및 실험동물에서 류머티스 관절염을 완화시키며 항염효과를 가진다는 것을 개시하였다. 또한, 신경병적 증상의 추정된(alleged) 향상을 보이는 복수의 반복적인 봉침을 시술받은 MS 환자들의 증례서술적 보고가 있음에도 불구하고, 세심한 연구의 수가 적음으로, 봉독효율성에 대한 명확한 결론을 내리지

못하였으며, 현재 MS 치료에서 봉독의 사용을 뒷받침할 수 있는 증거가 거의 없다.

[0010] 한편, 봉독은 대체의학으로서 널리 사용되고 있지만 벌의 독을 사용하는 경우, 과민반응 또는 쇼크반응 등의 위험이 존재하는 바, 구체적인 활성 성분 및 작용 메커니즘을 밝혀 더욱 순수하게 정제된 약물로서 사용하는 것이 필요하다.

[0011] 이에 본 발명자들은 질환에 대한 치료효과를 갖는 봉독의 활성 성분 및 그 작용 메커니즘에 대하여 예의 연구하여, 다양한 봉독의 성분 중 포스포리파아제 A2(PLA2) 특히, 리더서열이 제외된 분비형 봉독-PLA2 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드가 조절 T 세포를 활성화함으로써 자가면역성 질환, 알레르기성 질환, 또는 신경퇴행성 질환의 예방 및 치료에 효과를 나타냄을 확인하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 하나의 목적은 리더서열이 제외된 봉독-PLA2(BV-PLA2) 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 유효 성분으로 포함하는 이상 조절 T 세포 활성 저하 관련 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 리더서열이 제외된 봉독-PLA2(BV-PLA2) 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 유효성분으로 포함하는 이상 조절 T 세포(regulatory T cell; Treg) 활성 저하 관련 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물을 제공한다.

[0014] 상기 본 발명의 용어 "봉독(bee venom; BV)"은 꿀벌(Apis mellifera)의 복부에서 생성되는 산성 및 염기성 분비물의 혼합물로서 무색의 끈 액체형태를 띠며, 그 주된 성분은 펩타이드인 멜리틴(melittin), 아파민(apamin), 및 비만세포 탈과립화(mast cell degranulating; MCD) 펩타이드 및 효소인 포스포리파아제 A2(phospholipase A2; PLA2) 등이며, 이외 여러 가지 미량의 성분을 포함한다. 상기 본 발명의 용어 "봉독-PLA2(BV-PLA2; bee venom-phospholipase A2)"는 상기 봉독의 여러 가지 복합적 혼합물의 성분 중 포스포리파아제 A2를 의미하는 것이다. 포스포리파아제(phospholipase A2; PLA2)는 글리세롤을 두번째 탄소위치에서 가수분해하여 지방산을 생성하는 기능을 하는 효소로서, 인지질의 sn-2 아실 결합을 특이적으로 인식하여 가수분해 활성을 촉매하여 아라키돈산과 라이소인지질(lysophospholipid)을 방출한다. PLA2는 일반적으로 박테리아, 곤충이나 뱀뿐만 아니라 포유류의 조직에서도 발견된다. 본 발명의 봉독-PLA2는 꿀벌(Apis mellifera) 유래일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0015] 봉독-PLA2는 봉독에서 유래한 PLA2 기능을 가지는 것이면 특별한 제한이 없으나, 구체적으로 서열번호 1의 서열로 이루어질 수 있다. 상기 서열번호 1은 공지된 봉독-PLA2에 대한 유전자로부터 발현가능한 총 아미노산 서열이며(GenBank ID: ABQ28728.1), 실질적으로 분비되는 형태 즉, 분비형 봉독-PLA2는 N-말단의 리더서열이 제거된 형태이고, 구체적으로 서열번호 2의 아미노산 서열을 가질 수 있다(서열번호 1의 34 내지 167번의 아미노산으로 구성). 본 발명의 용어 "리더서열"은 봉독-PLA2가 분비형 봉독-PLA2로 성숙되는 과정에서 제거되는 서열로서, 서열번호 1의 아미노산 서열에 있어서 1 내지 33번 아미노산에 해당하는 서열일 수 있고, 구체적으로 서열번호 3의 서열일 수 있다. 본 발명에서 리더서열이 제외된 봉독-PLA2(BV-PLA2)는 분비형 봉독-PLA2와 동일한 의미로 사용된다. 상기 리더서열이 제외된 봉독-PLA2는 또한 성숙형이라고 불리기도 한다.

[0016] 본 발명에서 리더서열이 제외된 봉독-PLA2 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드는 상기 리더서열이 제외된 봉독-PLA2 아미노산 서열의 C-말단부위 및/또는 N-말단부위에 추가적으로 아미노산 서열을 더 포함하는 폴리펩티드일 수 있다. 구체적으로는 N-말단부위에 추가적으로 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드일 수 있으며, C-말단부위에는 추가적으로 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드일 수 있다. 더욱 구체적으로는 서열번호 6의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다. 상기 추가적인 아미노산 서열은 재조합 발현된 단백질의

정제를 위한 태그를 포함할 수 있다.

- [0017] 본 발명의 리더서열이 제외된 봉독-PLA2 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드는 봉독으로부터 공지된 방법에 의해 분리하여 제조하거나, 재조합 발현에 의해 제조하거나, 시중에서 이용 가능한 것을 구입하여 사용하거나, 합성하여 제조할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- [0018] 본 발명의 일 실시예에 의하면 분비형의 천연 BV-PLA2 아미노산 서열의 양말단에 정제를 위한 추가적인 아미노산 잔기를 연결하여 제조한 C-타입의 재조합 BV-PLA2(서열번호 6; 도 20B)가 천연 BV-PLA2에 상응하거나 또는 보다 향상된 활성을 나타내는 것을 확인하였다(도 21B 및 23). 반면, 분비형의 천연 BV-PLA2 아미노산 서열의 N-말단에 리더서열을 추가적으로 포함하여 제조한 F-타입 또는 N-말단에 리더서열을 추가적으로 포함하고 C-말단의 일부를 절단하여 제조한 B-타입 재조합 BV-PLA2(서열번호 7, 8; 도 20B)는 눈에 띄는 효소활성을 나타내지 못하였다(도 21B 및 23).
- [0019] 본 발명의 봉독-PLA2는 약 10 내지 18 kDa의 단백질로서 타 생물 또는 타 조직 유래 PLA2와는 그 구성이 상이하며, 특히 인간의 PLA2와는 단지 9%의 상동성을 갖는다(서열번호 2의 아미노산 서열 기준).
- [0020] 본 발명의 봉독-PLA2 아미노산 서열은 천연형 아미노산 서열뿐만 아니라 이의 서열유도체(mutein) 또는 봉독-PLA2 활성을 나타내는 그의 단편을 포함한다. 아미노산 서열 유도체란 천연 아미노산 서열 중의 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 상이한 서열을 가지는 것을 의미한다.
- [0021] 본 발명의 구체적인 실시예에 의하면, 분비형 천연 봉독-PLA2의 N-말단으로부터 34번째 아미노산인 히스티딘을 글루타민으로 치환시킨 변이체 재조합 단백질인 C-타입 변이체(H34Q) 재조합 봉독-PLA2에서 활성이 급격히 감소하는 것을 확인하였다(도 24 및 25). 따라서, 해당 자리는 효소활성에 필수적인 구성요소로서 적어도 34번 히스티딘을 포함하도록 제조하는 것이 바람직하다.
- [0022] 본 발명에서 봉독-PLA2 활성을 나타내는 그의 단편은 서열번호 9의 아미노산 서열을 가지는 것일 수 있다. 리더서열이 제외된 봉독-PLA2 단편의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드는 상기 리더서열이 제외된 봉독-PLA2 단편 아미노산 서열의 C-말단부위 및/또는 N-말단부위에 추가적으로 아미노산 서열을 더 포함하는 폴리펩티드일 수 있다. 구체적으로는 N-말단부위에 추가적으로 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드일 수 있으며, C-말단부위에는 추가적으로 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드일 수 있다. 더욱 구체적으로는 서열번호 10의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다. 상기 추가적인 아미노산 서열은 재조합 발현된 단백질의 정제를 위한 태그를 포함할 수 있다.
- [0023] 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 및 펩티드에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다(H. Neurath and R. L. Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly 간의 교환이다. 경우에 따라서는 인산화(phosphorylation), 황화(sulfation), 아크릴화(acrylation), 당화(glycosylation), 메틸화(methylation), 파네실화(farnesylation), 아세틸화(acetylation), 아밀화(amidation) 등으로 수식(modification)될 수도 있다.
- [0024] 상기 기술한 서열 유도체는 본 발명의 봉독-PLA2와 동일한 생물학적 활성을 나타내거나, 열, pH 등에 대한 구조적 안정성을 증대시킨 유도체일 수 있다.
- [0025] 상기 본 발명의 용어 "조절 T 세포(regulatory T cell; Treg)"는 억제 T 세포(suppressor T cell)라고도 불리는 헬퍼 T 세포(helper T cell; Th)의 일종이다. 다른 백혈구의 분화 및 활성화를 촉진하여 체액성 면역 촉진효과를 보이는 다른 헬퍼 T 세포와 달리, 면역을 억제하여 면역관용을 유지하여 항상성을 가지게 한다. 이는 정상 면역반응 동안 생성되는 Tr1 및 Th3 세포를 포함하는 적응(adaptive) Treg와 자연발생(naturally occurring) Treg로 분류할 수 있다. 자연발생 Treg는 흉선(thymus)에서 발생하며 CD4, CD25 및 Foxp3에 대해 양성의 표현형을 가지며 세포 내 분자인 Foxp3의 존재에 의해 다른 T 세포와 구별된다.
- [0026] 상기 본 발명의 용어 "이상 조절 T 세포 활성 저하 관련 질환"은 자가면역 방지, 면역관용, 염증에 의한 조직 손상 억제 등의 기능을 수행하는 조절 T 세포의 활성이 비정상적으로 저하되어 나타나는 질환으로서, 알레르기성 질환, 자가면역성 질환 및 신경퇴행성 질환을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0027] 자기(self)와 비자기(non-self) 항원의 구별은 면역학 분야에 있어서 가장 중요한 이슈로서, 수십 년간의 연구

를 통해 자가 항원(self antigen)에 대한 무반응(unresponsiveness)을 유지하는 중추 또는 말초 관용의 여러 메커니즘이 밝혀졌다. 자기-반응성 림프구의 클론 결핍 및 무반응(anergy; functional inactivation)의 기작 외에 조절 T 세포에 의한 자기 반응성 T 세포의 활성억제는 자가 항원에 대한 관용 유지에 있어 주요한 기작으로 여겨지고 있다.

[0028] 이중 자연발생 조절 T 세포로 알려진 $CD4^+CD25^+$ T 세포의 경우, foxp3이 Treg 세포 유도에 있어서 중요한 필수 조절 유전자라는 사실이 발견되기 전부터, 관용 및 자가면역성 질환의 예방에 있어 중요하다는 사실이 $CD25^+$ 세포 결여 T 세포 또는 $CD25^-$ T 세포를 T세포 결핍 누드 마우스에 양자 이입(adoptive transfer)한 마우스에서 다양한 다양한 종류의 자가면역성 질환을 유발할 수 있다는 실험적 사실을 통해 밝혀졌다(S. Sakaguchi, Annu. Rev. Immunol., 2004, 22: 531-562).

[0029] 직접적으로 foxp3의 변이가 사람에게서 다수의 내분비 기관들에서 자가면역성 질환(제1형 당뇨병, 갑상선염 등)을 유발하는 IPEX(X-linked immunodeficiency syndrome)를 유발한다는 것이 알려져 있는데(C. L. Bennett et al., Nat. Genet., 2001, 27: 20-21; R. S. Wildin et al., Nat. Genet., 2001, 27: 18-20), 이는 관용 및 자가면역성 질환의 예방에 있어서 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 조절 T 세포의 중요성을 말하고 제시한다.

[0030] IPEX 이외에도 제1형 당뇨병, 류머티스 관절염, 다발성 경화증, 건선(psoriasis) 등의 자가면역성 질환의 발병 기전에 있어 Treg 세포의 결핍 또는 억제기능 상실이 관여함이 밝혀졌다(M. Miyara et al., J. Immunol., 2005, 175: 8392-8400).

[0031] 자가면역성 질환 치료 및 조직 이식에서의 이식편 거부 예방에 있어 자가항원 특이적 조절 T 세포를 이용하려는 시도들이 이루어지고 있다. 이러한 시도들은 주로 변형 펩티드 리간드(altered peptide ligand; APL)를 이용한 펩티드 치료용 백신주사(peptide therapeutic vaccination)와 같이 자가항원 특이적 Treg 세포의 증폭을 생체 내에서 유도하거나 생체 외에서 증폭시켜 투여하는 체세포 치료의 형태로서, 자가면역을 유발하는 자가항원에 대해 특이적인 효과 T 세포의 기능을 억제하는 방법들이다(S. Sakaguchi, Nat. Immunol., 2005, 6: 345-352; J. A. Bluestone and Q. Tang, PNAS, 2004, 101: 14622-14626; M. Larche and D. C. Wraith, Nat. Med., 2005, 11: S69-76).

[0032] 병원체 특이적 조절 T 세포는 병원체의 제거에 있어서의 부정적 영향을 미치지만, 자가면역성 질환의 예방에서와 같이 병원체에 의해 유도되는 염증에 의한 조직 손상을 억제하여 면역병리를 조절하는 데 중요한 역할을 수행하고 있다(Y. Belkaid and B. T. Rouse, Nat. Immunol., 2005, 6: 353-360).

[0033] 한 예로, HSV를 foodpad를 통해 감염시킨 마우스를 통한 실험에서 $CD4^+CD25^+$ T 세포의 결여는 HSV 특이적 CD8 반응을 증가시켜 바이러스 제거를 향상시킬 수 있지만, T 세포 매개 병변을 더욱 악화시키는 것으로 나타난 사실을 들 수 있다(S. Suvas et al., J. Exp. Med., 2003, 198: 889-901).

[0034] 이는 자연 조절 T 세포의 제거나 효과기 분자(effector molecules)의 차단 등과 같이 조절 T 세포를 표적으로 하여, HIV, HCV와 같은 만성 바이러스성 감염에 대한 치료용 백신주사를 수행할 때 중요한 고려사항이 되고 있다(Y. Belkaid and B. T. Rouse, Nat. Immunol., 2005, 6: 353-360).

[0035] 상기 본 발명의 용어 "자가면역질환(autoimmune disease)"은 외래에서 들어온 물질을 파괴하거나 무기력화 시켜서 자신을 보호하는 일련의 작용인 면역에서 가장 중요한 단계인 자신과 외부에서 들어온 물질을 구분하지 못하여 자신의 물질을 외래의 것으로 잘못 판단하여 스스로 자신의 물질을 파괴하는 병을 포함할 수 있다. 예를 들어, 류머티스성 관절염, 전신성 경피증, 췌장세포 항체에 의한 인슐린 의존성 소아기 당뇨병, 원형탈모증, 건선, 천포창, 천식, 아프타구내염, 만성 갑상선염, 일부 후천성 재생불량성 빈혈, 일차성 간경변, 폐양성 대장염, 베체씨병, 크론씨병, 실리코시스, 아스베스토시스, IgA 신장질환, 연쇄상구균 감염 후 사구체신염, 쇼그렌 증후군, 길리안-바레증후군, 피부근염, 다발성 근염, 다발성 경화증, 자가면역성 용혈성 빈혈, 자가면역성 뇌척수염, 중증 근무력증, 그레이브씨 갑상선 항진증, 결절성 다발성 동맥염, 강직성 척추염, 섬유조직염, 측두동맥염, 윌슨병, 판코니증후군, 다발성 골수종 및 전신성 홍반성 루푸스 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 자가면역 질환은 바람직하게는 다발성 경화증 또는 자가면역성 뇌척수염이다.

[0036] 본 발명의 구체적인 실시예에 의하면, 봉독은 면역에 관여하는 조절 T 세포인 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg 및 $CD4^+CD25^+$ Treg에서 Foxp3의 발현을 증가시키는 반면(도 2) Th1/Th17 분화를 억제하여 EAE(experimental

autoimmune encephalomyelitis)를 완화시킬 수 있음을 확인하였다(도 5). 더불어 Treg 결핍이 상기 봉독의 EAE 완화효과를 차단시킴을 확인하여(도 6) Treg가 봉독에 의한 EAE 완화작용의 중요한 매개체로 작용함을 제시하였다. 이에 인간 $CD4^+ T$ 세포에 있어서 봉독에 의한 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg 증가 및 Th1/Th17 감소를 확인하여 봉독이 인간에서 면역 조절효과를 가짐을 입증하였다. 또한, 다양한 봉독 성분들의 면역 조절 유발효과를 측정하여 봉독 중 PLA2(분비형)가 면역 조절에 가장 뛰어난 효과를 갖는 성분임을 확인하고(도 8) 이를 인간세포에 적용하여 인간에서 면역 조절 유발이 가능함을 나타내었다(도 9).

[0037] 상기 본 발명의 용어 "알레르기성 질환(allergic disease)"은 면역체계의 이상으로 보통 사람에게는 무해한 물질이 특정인에게만 다양한 증상의 과민반응을 일으키는 질환을 의미한다. 상기 알레르기성 질환을 일으키는 물질은 알레르겐(allergen) 또는 항원이라고 하며, 꽃가루, 항생제, 약물, 먼지, 음식, 찬공기나 햇빛 등도 알레르기를 유발하는 원인이 될 수 있다. 상기 알레르기성 질환의 증상으로는 두드러기, 재채기, 가려움증, 콧물, 기침, 건초열, 충혈안, 습진, 발진 등이 있다. 상기 알레르기성 질환은 천식, 아토피 피부염, 결막염, 비염, 및 폐양성 대장염 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는 천식이며, 이는 기도협착, 폐점액분비 증가, 호흡곤란, 기침 등의 증상을 동반한다.

[0038] 본 발명의 구체적인 실시예에 의하면, 오브알부민(ovalbumin; OVA)으로 감작하여 천식을 유도한 OVA-유도 천식 마우스모델에서 BV-PLA2 처리시 대조군 및 다른 실험군에 비해 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg가 현저하게 증가되었으며(도 12), OVA 감작으로 증가된 폐조각으로의 염증성 세포 도입을 억제하는 효과가 뛰어남을 확인하였다(도 16). 뿐만 아니라, 기도과민성(AHR; airway hyperresponsiveness)을 완화시키는 효과도 나타내었다(도 18).

[0039] 상기 발명의 용어 "신경퇴행성 질환"이란 신경세포가 퇴화하고, 기능을 잃고, 그리고 사멸하는 경우 나타나는 증상들과 관련된 질환을 의미한다. 주로 진행성이어서 그 결과는 매우 파괴적이고, 상기 질환을 가진 환자들은 인지 또는 운동 능력에 있어서 극심한 퇴화를 겪을 수 있다. 상기 신경퇴행성 질환은 특별히 이에 제한되지 않으나, 파킨슨병(Parkinson's disease; PD), 알츠하이머병(Alzheimer's disease; AD), 루게릭병(amyotrophic lateral sclerosis; ALS), 헌팅턴병(Huntington's disease; HD), 전측두엽 치매(Fronto-Temporal Dementia), 피질-기저핵 퇴행증(Cortico Basal Degeneration), 및 진행성 핵상마비(progressive supranuclear palsy; PSP)를 포함한다. 상기 신경퇴행성 질환은 바람직하게는 파킨슨병일 수 있다.

[0040] 본 발명의 구체적인 실시예에 의하면, BV-PLA2(분비형)는 MPTP(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)-중독 마우스 즉 파킨슨병 동물모델의 SN(흑색질; substantia nigra)에서 DA(도파민성; dopaminergic) 신경세포사를 감소시키는 것을 확인하였다(도 19).

[0041] 본 발명에서, 용어 "예방"이란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 이상 조절 T 세포 활성 저하 관련 질환을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"란 상기 약학적 조성물의 투여에 의해 이상 조절 T 세포 활성 저하 관련 질환에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

[0042] 상기 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 용어 "약학적으로 허용가능한"이란 상기 조성물에 노출되는 세포나 인간에게 독성이 없는 특성을 나타내는 것을 의미한다. 상기 담체는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제, 기제, 부형제, 운환제 등 당업계에 공지된 것이라면 제한없이 사용할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸셀룰로즈, 미정질셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화 할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 전형적으로 막을 통과한 이동을 용이하게 하는 사용가능한 계면활성제로는 스테로이드에서 유도된 것이나, N-[1-(2,3-디올레오일)프로필-N,N,N-트리메틸암모늄클로라이드](DOTMA) 등의 양이온성 지질, 또는 콜레스테롤 헤미숙시네이트 등이 있다.

[0043] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 이상 조절 T 세포 활성 저하 관련 질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[0044] 본 발명에서, 용어 "개체"란 이상 조절 T 세포 활성 저하 관련 질환이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포

함한 모든 동물을 의미하고, 본 발명의 약학적 조성물을 개체에게 투여함으로써 상기 이상 조절 T 세포 활성 저하 관련 질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 기존의 이상 조절 T 세포 활성 저하 관련 질환 치료제와 병행하여 투여될 수 있다.

[0045] 본 발명의 용어 "투여"란, 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며 상기 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물 이외에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 진분, 칼슘 카보네이트, 수크로스, 또는 락토즈, 젤라틴 등을 섞어 조제한다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면, 습윤제 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 그러나 경구 투여시, 펩타이드는 소화가 되기 쉽기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화 하는 것이 바람직하다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔, 마크로골, 트윈61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤 제라틴 등이 사용될 수 있다. 펩타이드의 안정성이나 흡수성을 증가시키기 위하여 글루코스, 수크로스, 텍스트란 등의 카보하이드레이트, 아스코르빈산, 글루타치온 등의 항산화제, 킬레이팅 물질, 저분자 단백질 또는 다른 안정화제들을 사용할 수 있다.

[0046] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수도 있다. 바람직한 투여방식 및 제제는 정맥 주사제, 피하 주사제, 피내 주사제, 근육 주사제, 점적 주사제 등이다. 주사제는 생리식염액, 링겔액 등의 수성 용제, 식물유, 고급 지방산 에스테르(예, 올레인산에칠 등), 알코올 류(예, 에탄올, 벤질알코올, 프로필렌글리콜, 글리세린 등) 등의 비수성 용제 등을 이용하여 제조할 수 있고, 변질 방지를 위한 안정화제(예, 아스코르빈산, 아황산수소나트륨, 피로아황산나트륨, BHA, 토코페롤, EDTA 등), 유화제, pH 조절을 위한 완충제, 미생물 발육을 저지하기 위한 보존제(예, 질산페닐수은, 치메로살, 염화벤잘코늄, 페놀, 크레솔, 벤질알코올 등) 등의 약학적 담체를 포함할 수 있다.

[0047] 한편, 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 상기 용어 "약학적으로 유효한 양"이란 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 성별, 연령, 체중, 건강상태, 질병의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로, 및 배출 비율, 치료 기간, 배합 또는 동시에 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 활성물질을 약 0.01 mg/kg/일 내지 1000 mg/kg/일의 용량으로 투여할 수 있다. 경구 투여하는 경우, 50 내지 500 mg/kg의 범위가 적합할 수 있으며, 1일 1회 이상 투여할 수 있다.

발명의 효과

[0048] 본 발명의 리더서열이 제외된 봉독-PLA2 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드는 조절 T 세포를 활성화하는 한편, Th1/Th17 분화를 억제할 수 있다. 따라서, 본 발명의 폴리펩티드는 정제, 분리되지 않은 봉독의 사용으로 인해 발생할 수 있는 위험없이, 이상 조절 T 세포 활성 저하 관련 질환 즉, 자가면역성 질환, 알레르기성 질환 또는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0049] 도 1은 실험모델 마우스를 OVA로 감작시킨 시기 및 BV-PLA2(분비형)로 처리한 시점을 포함하는 알레르기성 천식 동물모델실험 프로토콜을 간략히 나타낸 개략도이다.

도 2는 봉독(bee venom; BV)의 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg 및 CD4⁺CD25⁺ Treg의 Foxp3 발현에 대한 영향을 나타낸 도이다. (A 및 B)는 Foxp3^{EGFP} C57BL/6 마우스의 지라세포를 다양한 농도의 봉독(0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 μ

g/ml)으로 24시간 동안 처리하고 항-CD4 및 항-CD25 항체로 염색하여 유세포분석한 결과이다. (A)는 $CD4^+$ T 세포에 대해 개방하고 CD25 및 Foxp3 양성세포를, (B)는 $CD4^+CD25^+$ T 세포에 대해 개방하고 Foxp3^{EGFP} 발현을 분석한 결과를 나타낸 도이다. (C 내지 E)는 Foxp3^{EGFP} C57BL/6 마우스로부터 분리한 세포를 봉독(1 μ g/ml)으로 24시간 처리하고 항-CD4 및 항-CD25 항체로 염색하여 유세포분석한 결과이다. (C)는 $CD4^+$ T 세포, (D)는 $CD4^+CD25^-$ T 세포 및 (E)는 $CD4^+CD25^+$ Treg 세포에 대한 유세포분석 결과를 나타낸 도이다. (A, C 및 D)의 도트 플롯 내의 숫자는 해당 사분면에 속하는 세포의 백분율을 나타낸다. (B 및 E)의 백분율은 $CD4^+CD25^+$ Treg 중 개방된 Foxp3^{high} 세포의 비율이다. 3회 반복실험하여 대표적인 하나의 그래프를 도시하였으며, 데이터는 평균 $\pm$ S.E.M(standard error of the mean; 평균치 표준오차)으로 나타내었다(* p <0.05, *** p <0.001 대 PBS-처리 세포군).

도 3은 생체 내 다양한 세포 군집의 비율에 대한 봉독의 영향을 나타낸 도이다. Foxp3^{EGFP} C57BL/6 마우스 또는 C57BL/6 마우스에 봉독(0.01, 0.1, 1, 10 mg/kg 체중) 또는 동일한 부피의 식염수를 5일간 매일 복강 내 주사하여 투여하였다. 지라세포의 단일-세포 현탁액을 형광 표지된 CD4, CD8a, CD19 및 CD25에 대한 항체로 염색하였다. (A)는 마우스 지라세포에서 측정된 $CD4^+CD25^+$ Treg의 백분율을 나타낸다. (B)는 $CD4^+CD25^+$ Treg에 대해 개방하여 측정된 Foxp 발현율을 나타낸 도이다. 백분율은 $CD4^+CD25^+$ Treg 중 개방된 Foxp3^{high} 세포의 비율이다. (C)는 $CD4^+$ T 세포에 대해 개방하여 측정된 CD25 및/또는 Foxp3 발현율을 나타낸 도이다. (A 및 C)의 도트 플롯 내의 숫자는 해당 사분면에 속하는 세포의 백분율을 나타낸다. (D)는 $CD4^+$ T 세포 중 $CD4^+CD25^+$ Foxp3⁺ Treg의 백분율 또는 지라세포 중 $CD4^+$ T 세포, CD8⁺ T 세포 및 B 세포의 백분율을 나타낸 도이다. 데이터는 평균 $\pm$ S.E.M으로 나타내었다(ns=유의하지 않음(not significant), * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 대 식염수-처리군).

도 4는 봉독의 시험관 내 항원-특이적 증식 억제 효과를 나타낸 도이다. EAE(experimental autoimmune encephalomyelitis) 유도 C57BL/6 마우스의 지라세포를 MOG₃₅₋₅₅ 펩타이드로 자극하고 72시간 후 계수하였다. 데이터는 평균 $\pm$ S.E.M으로 나타내었다(ns=유의하지 않음(not significant), # p <0.001 대 비자극세포, *** p <0.001 대 PBS-처리 세포).

도 5는 봉독의 Th1/Th17 분화 억제를 통한 EAE 완화효과를 나타낸 도이다. C57BL/6 마우스를 MOG₃₅₋₅₅ 펩타이드로 면역화하였다. (A)는 마우스를 면역화시킨 후 0일로부터 9일까지 봉독(1 mg/kg 체중)으로 처리하고 35일간 모니터링하여 측정된 평균 임상질환 점수를 나타낸 도이다(n=5/군). (B 내지 D)는 마우스를 면역화시킨 후 14일로부터 23일까지 봉독(1 mg/kg 체중)으로 처리하였다. (B)는 35일간 모니터링하여 측정된 평균 임상질환 점수이고(n=12/군), (C)는 지라세포를 모넨신(monensin) 존재하에 5시간 동안 PMA(50 ng/ml) 및 이오노마이신(ionomycin; 1 μ g/ml)으로 재자극시킨 후, 측정된 Th1/Th17의 백분율(n=11/군), 및 (D)는 24일에 수집하여 측정된 혈청 중 사이토카인 농도(n=8/군)를 나타낸 도이다. 지라세포를 모넨신(monensin) 존재하에 5시간 동안 PMA(50 ng/ml) 및 이오노마이신(ionomycin; 1 μ g/ml)으로 재자극시킨 후, 측정된 Th1/Th17의 백분율(n=11/군), 및 (D)는 24일에 수집하여 측정된 혈청 중 사이토카인 농도(n=8/군)를 나타낸 도이다. 수치는 평균 $\pm$ S.E.M으로 나타내었다(* p <0.05, ** p <0.01 대 식염수-처리군).

도 6은 $CD4^+CD25^+$ Treg 세포 결핍으로 인해 차단된 봉독의 EAE 완화효과를 나타낸 도이다. C57BL/6 마우스는 MOG₃₅₋₅₅ 펩타이드로 면역화하였다. 항-CD25 항체를 Treg 결핍 13일 및 19일(각각 봉독 처리 초기와 중간 시점)에 복강 내 주사로 투여하였다. (A)는 24일간 모니터링하여 측정된 평균 임상질환 점수를 나타낸 도이다. (B 및 C)는 면역화시킨 후 24일에 마우스를 치사시켜 분석한 결과이다. (B)는 지라세포를 모넨신(monensin) 존재하에 5시간 동안 PMA(50 ng/ml) 및 이오노마이신(ionomycin; 1 μ g/ml)로 재자극시킨 후, 측정된 Th1/Th17의 백분율(n=8/군), 및 (C)는 24일에 수집하여 측정된 혈청 중 사이토카인 농도(n=5/군)를 나타낸 도이다. 수치는 평균 $\pm$ S.E.M으로 나타내었다(ns=유의하지 않음(not significant)).

도 7은 봉독에 의한 $CD4^+$ Foxp3⁺ Treg의 증가 및 Th1/Th17의 감소를 나타낸 도이다. 인간 $CD4^+$ T 세포에 대해 개방하여 Foxp3⁺ Treg 또는 Th1/Th17을 분석하였다. (A)는 PBMC를 분리하여 봉독(1 μ g/ml)으로 24시간 처리한 후 개방된 $CD4^+$ Foxp3⁺ 세포의 비율을 백분율로 나타낸 것이다. (B)는 PBMC를 분리하여 봉독(1 μ g/ml) 및 항-

CD3/28 항체로 24시간 처리하였다. 이후, 세포를 모넨신(monensin) 존재하에 5시간 동안 PMA(50 ng/ml) 및 이오노마이신(ionomycin; 1 μ g/ml)으로 재자극하여 얻은 군집분포를 나타낸 도이다. 도트 플롯 내의 숫자는 각각 해당 사분면에 속하는 세포의 백분율을 나타낸다.

도 8은 다양한 봉독성분들의 면역-조절 유발 효과를 비교하여 나타낸 도이다. Foxp3^{EGFP} C57BL/6 마우스의 지라세포를 봉독 또는 그 성분으로 24시간 처리하고, 항-CD4 및 항-CD25 항체로 염색하여 유세포분석하였다. CD4⁺ T 세포에 대해 개방하고 CD25 및 Foxp3 양성 세포를 분석하였다. 도트 플롯 내의 숫자는 해당 사분면에 속하는 세포의 백분율을 나타낸다. 수치는 평균 $\pm$ S.E.M으로 나타내었다(* p <0.05, ** p <0.01 대 PBS-처리군).

도 9는 인간에서 분비형 BV-PLA2(bee venom-phospholipase A2; 분비형 봉독-PLA2)에 의한 면역-조절 유발을 나타낸 도이다. 인간 PBMC를 항-CD3/28 항체 및 봉독 또는 BV-PLA2로 24시간 동안 재자극하였다. 이후, 세포를 모넨신(monensin) 존재하에 5시간 동안 PMA(50 ng/ml) 및 이오노마이신(ionomycin; 1 μ g/ml)으로 재자극하였다. CD4⁺ T 세포에 대해 개방하여 Th1/Th17에 대해 분석하였다. 도트 플롯 내의 숫자는 해당 사분면에 속하는 세포의 백분율을 나타낸다.

도 10은 시험관 내 지라세포의 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg 군집을 나타낸 도이다. 항-마우스 CD3 항체 및 항-마우스 CD28 항체로 자극한 지라세포를 다양한 농도의 BV-PLA2(분비형)로 3일간 처리하였다. 측정값은 자극된 대조군으로부터의 수치에 대하여 표준화하였다. (A)는 대조군과 BV-PLA2(0.1, 1 μ g/ml) 처리된 지라세포로부터의 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg이다. 도트 플롯 내의 숫자는 해당 사분면에 속하는 세포의 백분율을 나타낸다. (B)는 대조군에 비해 BV-PLA2 처리군에서 현저히 증가된 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg의 백분율을 나타낸다. 데이터는 평균 $\pm$ S.E.M(standard error of the mean; 평균치 표준오차)으로 나타내었고 통계분석은 일방(one-way) ANOVA에 이어지는 Newman-Keuls 다중비교(multiple comparison) 테스트에 의해 수행되었다(* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001).

도 11은 사이토카인 생산에 대한 BV-PLA2(분비형)의 영향을 나타낸 도이다. 항-마우스 CD3 항체 및 항-마우스 CD28 항체로 자극한 지라세포를 다양한 농도의 BV-PLA2로 3일간 처리하였다. 배양 상등액을 수거하여 4℃에서 300 rcf로 10분간 원심분리하였고, 이후 사용을 위해 -70℃에 저장하였다. 측정값은 자극된 대조군의 수치에 대해 정상화하였다. 사이토카인은 cytometric bead array(CBA)를 이용하여 유세포분석기로 측정하였다. 데이터는 평균 $\pm$ S.E.M으로 나타내었고 통계분석은 일방 ANOVA에 이어지는 Newman-Keuls 다중비교(multiple comparison) 테스트에 의해 수행되었다(* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001).

도 12는 OVA(ovalbumin)유도 천식군에서 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg 군집을 나타낸 도이다. 각각 좌측 상단으로부터 시계방향으로 PBS만 처리한 대조군(CON); OVA 유도 후 무처리군(OVA); OVA 유도 후 BV-PLA2 주입군(OVA+PLA2); OVA 및 항-CD25 항체 주입 후 BV-PLA2(분비형) 주입군(OVA-T+PLA2), 및 OVA 유도 및 항-CD25 항체 주입군(OVA-T)에서의 결과를 나타낸다. 구체적으로 분리한 폐포세포를 항-CD4 알로피코시아닌(allophycocyanine) 및 항-CD25 피코에리트린(phycoerythrin; PE)으로 염색하여 유세포분석법으로 분석하였다. 데이터는 평균 $\pm$ S.E.M으로 나타내었고 통계분석은 일방 ANOVA에 이어지는 Newman-Keuls 다중비교(multiple comparison) 테스트에 의해 수행되었다(n=4).

도 13은 BALF(Bronchoalveolar Lavage Fluid; 기관지폐포 세척액)에서 IL-4 및 IL-13 사이토카인 생산에 대한 BV-PLA2(분비형)의 영향을 나타낸 도이다. Th2 염증성 사이토카인은 OVA+PLA2 및 CON에 비해 OVA, OVA-T 및 OVA-T+PLA2에서 증가하였다. 데이터는 평균 $\pm$ S.E.M으로 나타내었고 통계분석은 일방 ANOVA에 이어지는 Newman-Keuls 다중비교(multiple comparison) 테스트에 의해 수행되었다(*** p <0.001, ** p <0.05 대 CON, n=4).

도 14는 대조군 및 실험군의 혈청 내 IgE 수준을 나타낸 도이다. 심장천자(cardiac puncture)로 채혈하고 시료 중 IgE 수준을 ELISA로 분석하였다. 데이터는 평균 $\pm$ S.E.M으로 나타내었고 통계분석은 일방 ANOVA에 이어지는 Newman-Keuls 다중비교(multiple comparison) 테스트에 의해 수행되었다(* p <0.05, ** p <0.01 대 CON, n=4).

도 15는 OVA-유도 천식 마우스의 기도로의 백혈구 도입에 대한 BV-PLA2(분비형)의 영향을 나타낸 도이다. OVA-유도 천식 생쥐모델을 확립하고 마우스의 폐로부터 BALF를 획득하였다. 상기 BALF로부터 총세포, 호산구, 대식세포, 중성구, 및 림프구를 계수하였다. 데이터는 평균 $\pm$ S.E.M으로 나타내었고 통계분석은 일방 ANOVA에 이어지는 Newman-Keuls 다중비교(multiple comparison) 테스트에 의해 수행되었다(* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 대 CON 및 OVA, n=4).

도 16은 OVA-유도 알레르기성 천식 마우스의 폐조직에서의 염증성 세포 도입에 대한 BV-PLA2(분비형)의 영향을 나타낸 도이다. Balb/c Foxp3^{EGFP} Balb/c 마우스를 OVA로 감작하고 시험감염시켰다. 폐조직은 헤마토자일린 및 에오신(hematoxylin and eosin; H&E)으로 염색하였다(배율 400×). (A)는 PBS로 처리한 PBS-시험감염 마우스(CON); (B)는 PBS로 처리한 OVA-시험감염 마우스(OVA); (C)는 BV-PLA2(0.2 mg/kg)로 처리한 OVA-시험감염 마우스(OVA+PLA2); (D)는 BV-PLA2(0.2 mg/kg)로 처리한 OVA 및 항-CD25 항체-시험감염 마우스(OVA-T+PLA2); 및 (E)는 OVA 및 항-CD25 항체-시험감염 마우스(OVA-T)에서의 결과를 나타낸 도이다.

도 17은 OVA-유도 알레르기성 천식 마우스의 폐조직에서의 조직병리학적 변화에 대한 BV-PLA2(분비형)의 영향을 나타낸 도이다. 폐조직은 과요오드산 쉬프(periodic acid-Schiff; PAS)로 염색하였다(배율 400×). (A)는 PBS로 처리한 PBS-시험감염 마우스(CON); (B)는 PBS로 처리한 OVA-시험감염 마우스(OVA); (C)는 BV-PLA2(0.2 mg/kg)로 처리한 OVA-시험감염 마우스(OVA+PLA2); (D)는 BV-PLA2(0.2 mg/kg)로 처리한 OVA 및 항-CD25 항체-시험감염 마우스(OVA-T+PLA2); 및 (E)는 OVA 및 항-CD25 항체-시험감염 마우스(OVA-T)에서의 결과를 나타낸 도이다.

도 18은 OVA-유도 마우스 천식모델에서 메타콜린(methacholine)에 대한 기도과민성(hyperresponsiveness)에 대한 BV-PLA2(분비형)의 영향을 나타낸 도이다. OVA-유도 마우스는 50 및 100 mg/ml 농도의 메타콜린에서 높은 P_{enh} 값을 갖는다(*p<0.01 대 CON). OVA+PLA2는 100 mg/ml 메타콜린을 사용한 OVA-유도 마우스의 P_{enh} 값을 현저히 감소시켰다(OVA에 대해 **p<0.01 대 PLA2).

도 19는 MPTP(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)-중독 마우스의 SN(흑색질; substantia nigra)에서 DA(도파민성; dopaminergic) 신경세포사에 대한 BV-PLA2(분비형)의 예방효과를 나타낸 도이다. MPTP-중독 마우스를 BVPLA2(0.5 mg/kg) 또는 식염수로 마지막 MPTP 주사 후 12시간에 시작하여 6일간 처리하였다. 몇몇 마우스에 대해서는 MPTP 투여 1일 전 항-CD25 항체(1 mg/kg)를 투여하였다. MPTP 중독 7일 후, 뇌질편을 DA 뉴런에 대하여 α-TH 항체로 면역염색하였다. (A)는 식염수-주사 마우스에 식염수를, (B)는 MPTP-중독 마우스에 식염수를, (C)는 MPTP-중독 마우스에 BV-PLA2를 처리한 결과이다. (D 및 E)는 TH 양성 뉴런의 수를 계수하여 도시하였다. 각 실험군으로는 9 내지 8 마리의 실험동물을 사용하였다. (A 내지 C)의 스케일 바는 200 μm이다(*p<0.001 대 식염수-처리 대조군, #p<0.01 대 MPTP-중독 마우스).

도 20은 (A) 재조합 BV-PLA2 발현을 위한 벡터구조 및 (B) 네 가지 타입의 재조합 BV-PLA2의 아미노산 서열 구성을 나타낸 도이다.

도 21은 (A) 제조된 재조합 단백질을 확인하기 위한 SDS-PAGE 및 (B) 각각의 효소활성 분석결과를 나타낸 도이다.

도 22는 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 조절 T 세포에 대한 천연 및 재조합 BV-PLA2의 영향을 확인하기 위하여 항-CD4 및 항-CD25 항체로 염색하여 유세포분석한 결과이다.

도 23은 CD4⁺ 세포 중 Foxp3⁺ 군집에 대한 천연 및 재조합 BV-PLA2의 영향을 나타낸 도이다.

도 24는 (A) 제조된 C-타입 재조합 BV-PLA2 및 C-타입 변이체(H34Q) 재조합 BV-PLA2를 확인하기 위한 SDS-PAGE 및 (B) 천연 분비형 BV-PLA2 및 상기 효소들의 활성을 비교하여 나타낸 도이다.

도 25는 (A) 지라세포 및 (B) CD4⁺ 세포 중 Foxp3⁺ 군집에 대한 천연 분비형 BV-PLA2, C-타입 재조합 BV-PLA2 및 C-타입 변이체(H34Q) 재조합 BV-PLA2의 영향을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0050] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0051] 실시예 1: 실험동물 준비

[0052] C57BL/6 암컷 마우스(7 내지 8주령, 체중 18 내지 23 g)를 Charles River Korea(성남, 한국)로부터

구입하였다. $\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}$ C57BL/6(C. *Cg-Foxp3tm2Tch/J*) 마우스는 Jackson Laboratory(Bar Harbor, ME, USA)로부터, 7 내지 8주령의 수컷 C57BL/6J 마우스(21 내지 22 g)는 Charles River Breeding Laboratory(Yokohama, Japan)으로부터 구입하였다. 모든 마우스는 냉방 및 12시간 명/암 순환을 갖춘 무균 조건하에 보관하였다. 또한, 모든 마우스는 실험동안 자유롭게 음식과 식수에 접근할 수 있었다. 본 연구는 경희대학교 동물실험윤리위원회에 의해 승인되었다.

[0053] 1.1. EAE(experimental autoimmune encephalomyelitis) 유도 실험동물모델

[0054] 마우스 MOG_{35-55} (M-E-V-G-W-Y-R-S-P-F-S-R-V-V-H-L-Y-R-N-G-K) 펩타이드를 펩트론(대전, 한국)으로부터 구입하였다. 펩타이드는 95% 이상의 순도를 보증하기 위해 HPLC로 정제하였다. EAE를 유도하기 위해, C57BL/6 마우스에 결핵균(*mycobacterium tuberculosis*) 100 μg 을 포함하는 CFA(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)에 녹인 MOG_{35-55} 펩타이드 200 μg 을 옆구리 뒤편(hind flank)에 피하주사한 후, 0일과 2일에 백일해 독소(pertussis toxin; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 400 ng을 추가적으로 복강 내 주사하였다. 마우스를 매일 관찰하여 질환의 임상적 징후를 확인하고 0.5 간격으로 0 내지 5 범위에서 점수화하였다; 0, 임상적 징후 없음; 1, 꼬리 이완; 2, 뒷다리 약화 또는 이상 보행; 3, 완전한 뒷다리 마비; 4, 앞다리 약화 또는 마비를 동반하는 완전한 뒷다리 마비; 및 5, 빈사 또는 사망.

[0055] 1.2. 알레르기성 천식(allergic asthma) 실험동물모델

[0056] 6 내지 8주령 암컷 $\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}$ Balb/c 마우스를 준비하였다. 0일째의 마우스를 음성대조군(PBS-처리; CON)(n=4)과 OVA-유도 천식군으로 나누었다. OVA-유도 천식군은 4개의 군으로 재분류하였다(PBS로 처리한 OVA-시험감염 마우스(OVA); BV-PLA2(0.2 mg/kg)로 처리한 OVA-시험감염 마우스(OVA+PLA2); BV-PLA2(0.2 mg/kg)로 처리한 OVA 및 항-CD25 항체-시험감염 마우스(OVA-T+PLA2); 및 OVA 및 항-CD25 항체-시험감염 마우스(OVA-T), n=4/군). 간략하게, 마우스에 0일째와 14일째에 100 μl PBS에서 수산화 알루미늄 20 mg으로 침전시킨 100 μg 오브알부민(ovalbumin; OVA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 복강 내 주사(intraperitoneal(i.p.) injection)하여 감작시켰다. 마우스에 20일째로부터 30일째까지 6회에 걸쳐 마이크로파이펫터로 50 μl PBS의 1% OVA를 직접 콧구멍에 투여하여 시험감염시켰다. 음성대조군 마우스는 PBS 만으로 감작시키고 시험감염시켰다.

[0057] Treg 결핍 마우스는 1, 8, 15일째에 0.25 mg 항-CD25 항체를 복강 내 주사하였다. 항-마우스 CD25 랫트 IgG1(항-CD25; 클론 PC61)을 American Type Culture Collection(Manassas, VA, USA)으로부터 수득한 하이브리도마로부터 자체 제작하였다. Treg 결핍 효율은 PE-항-마우스 CD25 및 FITC(플루로레신 이소티오시아테이트)-항-마우스 CD4를 이용하여 유세포분석으로 확인하였다. PLA2 시험감염군은 3일째로부터 17일째까지 0.2 mg/kg의 PLA2를 6회에 걸쳐 복강 내 주사하였다. 31일째에 AHR(기도과민성; airway hyperresponsiveness)을 평가하기 위해(비침습적) 폐기능측정(lung function measurement; All Medicus, 서울, 한국)을 사용하여 분석하였고, 32일째에 마우스를 치사시키고 분석을 위해 다양한 조직을 수집하였다(도 1).

[0058] 1.3. MPTP(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)-중독 파킨슨병 실험동물모델

[0059] 7 내지 8주령 수컷 C57BL/6J 마우스(21 내지 22 g; Charles River Breeding Laboratory, Yokohama, Japan)를 준비하였다. MPTP 중독 모델 제작을 위해, 마우스에 MPTP-HCl(20 mg/kg 유리염기 식염수 용액; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 두시간 간격으로 4회 복강 내 주사하였다. 마지막 MPTP 주사 후 12시간에, MPTP-중독 마우스에 BV-PLA2(0.5 mg/kg)를 복막 내로 1일 1회씩 6일간 주사하였다. 일부 마우스에는 BV-PLA2 또는 비히클만을 대조군으로서 주사하였다. Treg 세포를 결핍시키기 위해, 일부 마우스에 항-CD25 항체(1 mg/kg) 또는 정상 랫트 IgG(1 mg/kg)를 MPTP 투여 1일 전 단회 복강 내 주사하였다.

[0060] 실시예 2: 인간 PBMC(peripheral blood mononuclear cells) 분리

[0061] 인간 PBMC는 헤파린나트륨이 담긴 BD Vacutainer™ CPT 튜브를 이용하여 채혈한 건강한 공여자의 혈액으로부터

분리하였다. 간략하게, 정맥천자(venipuncture)를 통해 튜브에 직접 채혈하고 1600 g에서 20분간 원심분리하였다. 피펫을 사용하여 상기 원심분리된 젤 상단에 있는 세포를 회수하여 PBS로 2회 세척하였다. 본 발명은 경희대학교 한의학센터 임상시험심사위원회에 의해 승인되었다.

[0062] 실시예 3: 마우스 T 세포 분리

[0063] $CD4^{+}$, $CD4^{+}CD25^{-}$ T 세포 및 $CD4^{+}CD25^{+}$ Treg를 암컷 Foxp3^{EGFP} C57BL/6 마우스로부터 얻은 지라세포로부터 자기구슬 분리법(magnetic bead separation; $CD4^{+}$ T 세포 분리 키트 및 $CD4^{+}CD25^{+}$ 조절 T 세포 키트; Miltenyi Biotec, GmbH, Bergisch Gladbach, Germany)을 사용하여 제조업자의 지시에 따라 분리하였다. 모든 군집의 순도는 유세포분석에 의해 결정하였으며 통상적으로 90% 이상에 달한다.

[0064] 실시예 4: 시약 및 투여방법

[0065] 봉독(bee venom; BV), 멜리틴(melittin), 분비형 봉독 유래 포스포리파아제 A2(bee venom-phospholipase A2; BV-PLA2), 비만세포 탈과립화 펩타이드(mast cell degranulating peptide; MCD) 및 아파민(apamin)은 시험관 내 실험을 위해 PBS 용액을 제조하였다. 각 성분은 독물의 비율에 따라 멜리틴은 50%, BV-PLA2는 10%, 아파민은 2% 및 MCD는 1%의 용량으로 사용하였다. 봉독 및 봉독의 모든 성분은 시그마-알드리치(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 봉독은 0.9% 식염수에 1 mg/ml의 농도로 녹여 원액을 제조하였다. 봉독 원액은 용량 의존성 생체 내 실험을 위해 농도별로 희석하여 사용하였다. 봉독(0.01, 0.1, 1, 10 mg/kg 체중) 또는 동일한 부피의 식염수를 매일 마우스에 복강 내 주사로 투여하였다.

[0066] 실시예 5: 증식분석

[0067] EAE 유도 마우스 모델에서, 질환의 증상이 정점에 달했을 때 MOG₃₅₋₅₅ 펩타이드로 면역화된 마우스의 지라세포를 분리하였다. 간략하게, 지라세포를 2×10^6 /ml 농도로 10% FBS, 50 IU/ml 페니실린, 50 µg/ml 스트렙토마이신, 10 µg/ml MOG₃₅₋₅₅ 펩타이드 및 봉독(0.01, 0.1, 1, 10 µg/ml)을 추가한 RPMI 1640에 72시간 배양하였다. 항원 특이적 증식에 대한 BV의 억제능을 결정하기 위하여, 지라세포 수를 혈구계를 사용하여 계수하였다. 모든 실험은 3회 반복 수행하였다.

[0068] 실시예 6: 유세포 분석

[0069] 하기의 방법으로 준비된 시료에 대한 모든 유세포분석은 FASC Calibur flow cytometer(BD Bioscience, San Jose, CA, USA)를 사용하여 데이터를 수집하여 CellQuest Pro 소프트웨어(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)로 분석하였다.

[0070] 6.1. EAE 유도 동물모델실험에서 유세포 분석을 위한 세포 준비

[0071] Treg를 정의하기 위하여, Foxp3^{EGFP} C57BL/6 마우스로부터 수득한 분리된 단일-세포 현탁액 및 지라세포, 및 건강한 공여자로부터의 PBMC를 표준 염색법을 이용하여 항-CD4 및 항-CD25 또는 항 Foxp3 단클론항체(eBioscience, San Diego, CA, USA)로 표지하였다. 마우스와 인간 세포에서 세포 내 사이토카인 발현을 검출하기 위해, cytofix/cytoperm 키트(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 사용하여 제조업자의 지시에 따라 세포 내 염색을 수행하였다. 간략하게, 세포를 50 ng/ml PMA 및 1 µg/ml 이오노마이신(ionomycin)(both from Sigma-

Aldrich, St. Louis, MO, USA)으로 5시간동안 BD GolgiStop™ 단백질 이동 억제제 존재하에 재자극하였다. 세포를 BD 마우스 또는 인간 Th1/Th2/Th17 표현형(phenotyping) 각테일로 제조업자의 지시에 따라 염색하였다. 사이토카인 생산을 검출하기 위해, 분비된 사이토카인을 마우스 cytometric bead array(CBA; BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 사용하여 제조업자의 지시에 따라 측정하였다. 면역화시킨 후 24일에 혈청을 수집하여 CBA 분석에 사용하기에 앞서 -20℃에 보관하였다.

[0072] 6.2. 알레르기성 천식 유도 동물모델실험에서 유세포 분석을 위한 세포 준비

[0073] Foxp3^{EGFP} Balb/c 마우스의 지라(spleen)에서 CD4⁺ 세포를 분리한 후, 하룻동안 항-CD3e(2.5 µg/ml)로 코팅한 플레이트에 CD4⁺ T 세포를 4×10^6 세포/ml의 농도로 200 µl씩 둥근 바닥 96웰 플레이트에 시딩(seeding)한 후 항-CD28(2 µg/ml)로 공동자극(costimulation)하고, 0.1, 1 µg/ml 농도의 봉독-PLA2를 첨가하여 3일 동안 37℃, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. 배양액은 사이토카인 측정을 위해 보관하였다. 이후에 세포 표면 마커인 CD4와 CD25 항체(anti-CD4-APC 및 anti-CD25-PE mAbs)를 첨가하여 4℃에 30분간 격리하였다. DPBS(Dulbecco's phosphate buffered saline, w/GENE) 1 ml로 300 ×g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 제거한 뒤, DPBS 300 µl로 재현탁하여 CD4⁺CD25⁺ Treg 및 Foxp3 발현량을 측정하였다.

[0074] 또한 폐조직세포의 분석을 위해, 폐를 적출하고 PBS로 세척하여 혈액을 제거하였다. 조직을 작게 자르고 1% RBC 용해 완충액(RBC lysis buffer; BD Pharmingen)에서 적혈구를 용해시켰다. 적혈구 용해 후, 폐조직을 25 µm 세포 여과기에 통과시켰다. 세포는 3회 세척하여 FCM 완충액(2% FBS 및 0.1% NaN₃를 포함하는 PBS)에 재현탁하였다. FOXP3^{EGFP} Balb/c 마우스로부터 획득한 단일 세포 현탁액 및 폐세포는 표준 염색법을 이용하여 항-CD4-APC 및 항-CD25-PE 단클론항체로 표지하였고 특정 시료로 염색된 세포의 백분율은 CellQuest 소프트웨어(BD Biosciences)를 사용하여 FACS Calibur에 의해 분석하였다.

[0075] 실시예 7: 배양 상층액의 사이토카인 측정

[0076] 알레르기성 천식 유도 모델에서, 항-마우스 CD3 항체 및 항-마우스 CD28 항체에 의해 자극된 지라세포를 다양한 농도의 BV-PLA2로 3일간 처리하였다. 배양 상층액을 수거하여 4℃에서 300 rcf로 10분간 원심분리하고 이후 사용을 위해 -70℃에 저장하였다. 측정된 사이토카인 수준은 자극된 대조군의 사이토카인 수준에 대하여 표준화하였다. 사이토카인은 마우스 cytometric bead array(CBA, BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 사용하여 측정하였다. 간략하게, 50 µl의 시료 또는 기지의 농도의 표준시료(0-5000pg/ml)를 50 µl의 캡처 항체 비드 용액과 검출 항체 피코에리트린(phycoerythrin; PE) 시료의 혼합물에 첨가하였다. 이후 혼합물을 빛을 피해 실온에서 두시간 동안 인큐베이션하고, 세척하여 결합하지 않은 검출 항체 PE 시료를 제거하였다. 데이터는 유세포분석기(FACS Calibur, BD Biosciences Corp., San Jose, CA, USA)로 수집하여 컴퓨터(CBA 소프트웨어 1.1; BD Biosciences Corp.)로 분석하였다.

[0077] 실시예 8: 기관지 폐포 세척(bronchoalveolar lavage; BAL)

[0078] 알레르기성 천식 유도 모델에서, 병냉의 PBS 1 ml를 주입하고 추출하여 BAL을 수득하였다. 상기 과정을 3회 반복하여 세척을 수집하였다(평균부피 2.0 ml). 회수된 BAL(70-80%)은 13000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 세포 침전물은 1ml PBS에 재현탁하여 세포원심(cytocentrifugation)을 사용하여 유리슬라이드에 부착시켰다. 총 생존세포수는 트리판 블루 배제법(trypan blue exclusion)을 사용하여 혈구계로 측정하였다. 호산구, 중성구, 림프구, 및 대식세포의 감별계산은 500개 세포를 계수한 후 디프-퀵 염색(Diff-Quick; Life Technologies, Auckland, New Zealand)으로 염색한 개별 마우스로부터의 기관지 폐포 세척액(bronchoalveolar lavage fluid; BALF) 시료(5×10^5 세포/200 µl)의 사이토스핀 도말표본으로 결정하였다. 이후, BALF는 원심분리하여 상층액을

-70℃에 저장하였다. 결과는 총세포수 $\times 10^4$ 으로 표현하였다.

[0079] 실시예 9: 효소결합 면역흡착 측정법(enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)을 이용한 BALF 중 Th2 사이토카인의 분석

[0080] 알레르기성 천식 유도 모델에서, Th2 사이토카인 IL-4 및 IL-13의 농도를 정량적 샌드위치 효소결합면역분석 키트(BD, San Diego, USA for IL-4 및 R&D, Minneapolis, USA for IL-13)로 측정하였다. 96웰 마이크로 플레이트를 코팅 완충액에서 항-마우스 IL-4 및 IL-13 단클론 항체와 4℃에서 밤새도록 인큐베이션하고, 0.05% 트윈 20(Sigma, MO, USA)을 포함한 PBS로 세척한 후, 각각 5% FBS를 포함한 PBS로 4℃에서 1시간 동안 및 1% BSA를 포함한 PBS에서 실온에서 1시간 동안 차단하였다. 이어, 100 μ l BALF를 주입하여 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 2차 과산화효소는 분석 희석제(assay diluent)에서 1시간 동안 바이오틴화 항-마우스 IL-4 및 IL-13 단클론 항체를 표지하였다. 마지막으로, 플레이트를 TMB 기질액(KPL, San Diego, USA)으로 30분간 처리하고 TMB 정지액 50 μ l를 각 웰에 첨가하여 반응을 정지시켰다. 마이크로 플레이트 리더(SOFT max PRO, 버전 3.1 소프트웨어, CA, USA)로 450 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 이때 IL-4와 IL-13 ELISA에 대한 검출 한계는 각각 500과 100 ng/ml이다.

[0081] 실시예 10: ELISA를 이용한 혈청 IgE 역가 측정

[0082] 알레르기성 천식 유도 모델에서, 질환 유도 후 32일에 에테르로 마취시킨 후 마우스의 안후총(retro-orbital plexus)으로부터 채혈하였다. 혈청시료를 원심분리로 수득하여 분석시까지 -20℃에 보관하였다. 혈청에 대해, 96웰 면역 마이크로 플레이트(Costar, NY, USA)를 항-마우스 IgE 단클론 항체로 코팅하였다. 혈청을 5% FBS를 포함하는 PBS(분석 희석제)로 1:250으로 희석하였다. IgE 측정(BD Pharmingen)을 제조업자의 프로토콜에 따라 표준화된 샌드위치 ELISA에 사용하였다. 마이크로 플레이트 리더(SOFT max PRO, 버전 3.1 소프트웨어, CA, USA)로 450 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 이때 IgE ELISA에 대한 검출 한계는 100 ng/ml이다.

[0083] 실시예 11: 조직학적 검사(histological examination)

[0084] 알레르기성 천식 유도 모델에서, 기관 및 폐조직을 마우스로부터 제거하였다. 먼저 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)에 고정하고, 탈수시켜 파라핀에 함몰시킨 후, 6 μ m 절편으로 자르고, 헤마토자일린 & 에오신(Hematoxylin & Eosin; H&E)과 과요오드산쉬프(Periodic Acid Schiff; PAS) 시약으로 염색하였다.

[0085] 실시예 12: 메타콜린(methacholin)에 대한 기도과민성(airway hyperresponsiveness; AHR) 측정

[0086] 알레르기성 천식 유도 모델에서, 1% OVA를 포함하는 PBS 50 μ l를 투여하여 마지막으로 시험감염한 바로 다음날, 실험동물을 기압 체적기록계 챔버(barometric plethysmographic chamber; All Medicus, Seoul, Korea)에 위치시켜 분석하였다. 기준선 읽기(baseline reading)는 3분간 행하였다. 증가된 휴지(enhanced pause; P_{enh})는 제조업자의 프로토콜에 따라 계산하였다[즉, (날숨 시간/이완 시간-1) $\times$ (최대 날숨 흐름/최대 들숨 흐름)]. P_{enh} 는 최대 들숨 상자 압력 신호에 대한 최대 날숨비의 함수 및 날숨 시간의 함수를 나타내는 무단위 변수이다. 결과는 각각의 농도의 메타콜린(0, 50 및 100 mg/ml) 시험감염에 따른 P_{enh} 의 백분율 증가로 표현하였다.

[0087] 실시예 13: 면역조직화학(immunohistochemistry)

[0088] MPTP-중독 파킨슨병 동물모델에서, 0.5% 질산나트륨과 헤파린(10 U/ml)을 포함하는 식염수 용액을 경심관류시킨(transcardially perfused) 후 0.1M 인산완충액(phosphate buffer; PB)에 녹인 4% 파라포름알데히드로 고정하였다. 뇌는 제거하여 완충화한 4% 파라포름알데히드에 4℃에서 밤새도록 고정시킨 후, 침몰될 때까지 30% 수크로즈 용액에 4℃에서 보관하였다. 뇌는 슬라이딩 마이크로톰(sliding microtome)을 이용하여 30 μm 두께의 관찰 절편으로 분획하여 냉동하였다. 모든 분획은 6개의 분리된 계열을 수집하여 면역조직화학 염색을 수행하였다. 일차 항체는 타이로신 수산화효소(tyrosine hydroxylase; TH; 1:2000, Pel-freez, Brown Deer, WI)에 대응하는 것들을 포함한다. 염색된 세포는 가시화하여 명시야 현미경(brightfield microscope; Nikon, Tokyo, Japan)으로 분석하였다.

[0089] 실시예 14: 재조합 BV-PLA2의 제조 및 활성분석

[0090] 봉독-PLA2 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 재조합 발현으로 제조하기 위하여, E.coli DH5α 및 E.coli BL21 (DE3)을 각각 유전자 조작 및 단백질 발현을 위한 균주로 사용하였다.

[0091] 14.1. 균주의 배양 및 재조합 단백질의 정제

[0092] 단백질 대량생산을 위하여, 5 ml의 선택된 균주의 신선한 밤샘 배양액을 앰피실린 항생제를 포함하는 1 L의 LB 배지로 희석시켰다. 발현 플라스미드를 포함하는 재조합 E.coli BL21 (DE3) 세포를 600 nm에서 흡광도 값이 약 0.9에 도달할 때까지 교반하면서(200 rpm) 37℃에서 배양하였다. 재조합 PLA2의 발현은 배양액에 1 mM 이소프로필-β-d-티오갈락토피라노사이드(isopropyl-β-d-thiogalactoside; IPTG)를 첨가함으로써 대수증식기(logarithmic growth phase)에서 유도되었다. 4℃에서 20분간 3000 rpm으로 원심분리하여 세포를 회수하였다. 세포펠렛을 완충액 A(50 mM 인산나트륨 완충액, pH 8.0, 0.1 mM PMSF 및 5 mM β-머캅토에탄올)에 현탁시켰다. 초음파 분쇄기로 세포를 파쇄한 후 4℃에서 10분간 12000 rpm으로 원심분리하고 완충액 B(50 mM 인산나트륨 완충액, pH 8.0, 2% 트리톤 X-100, 20 mM EDTA, 0.5 M NaCl)으로 세척하여 불용성 펠렛을 제조하였다. 이후, 완충액 C(8 M 우레아를 포함하는 완충액 A)에서 12시간 이상 변성시켰다. 변성된 재조합 PLA2와 혼합된 불용성 세포 파편(debris)은 4℃에서 20분간 12000 rpm으로 원심분리하여 제거하였다. 고정된 금속 친화성 크로마토그래피에 의한 히스티딘-표지 재조합 PLA2 단백질의 정제를 위하여 His GraviTrap affinity column(GE Healthcare, Piscataway, NJ)을 이용하였다. 히스티딘-표지 재조합 PLA2 단백질은 3 L의 5 mM 아세트산으로 4℃에서 12시간 동안 2회 투석하고 동결건조시켰다.

[0093] 14.2. 단백질 재접힘(refolding)

[0094] 상기 동결건조시킨 단백질을 7 M 구아니딘-HCl에 녹이고, 시스테인 티올을 술폰화하기 위하여 0.3 M Na2S03 (pH 8.3) 및 1/20 부피의 탄하우저(Thannhauser) 시약 용액을 가하였다. 용액을 신선하게 제조된 3 L의 2 M 우레아, 4 mM EDTA, 0.1 M NH4Cl, 20 mM 보론산 나트륨(pH 8.3)에 대해 4시간 동안 투석하고 투석 용액은 신선한 용액으로 교환하였다. 추가적인 4시간의 투석 후, 0.5 M 시스테인 수용액 56 ml와 1 M HCl 용액에 녹인 0.2 M 시스틴 용액을 투석 용액에 첨가하고 10 M NaOH를 이용하여 pH를 8.3으로 조절하였다. 해당 시점에서 투석액을 알루미늄 포일로 씌운 비커에 옮겼다. 활성이 최대일 때(일반적으로 시스테인 및 시스틴을 첨가한 후 18 내지 20시간), 응집된 침전으로부터 단백질 용액을 따라내어 3 L의 SP 완충액(50 mM Tris-HCl, pH 9.0)으로 4℃에서 14시간 동안 투석하였다. 단백질의 순도는 stacking 및 separating gel을 위한 15%(w/v) 폴리아크릴아미드를 이용하여 SDS-PAGE로 확인하였다.

[0095] 14.3. 재조합 단백질의 활성분석

[0096] DOPC를 기질로 사용하는 EnzCheck[®] 포스포리파아제 A2 분석 키트(Invitrogen)를 사용하여 효소활성을 결정하였

다. 제조업자의 프로토콜에 따라 EnzCheck[®] 포스포리파아제 A2 분석 키트를 사용하여 BV-PLA2 및 재조합 PLA2의 효소활성을 분석하였다.

[0097] 실시예 15: 발현 플라스미드의 구성 및 자리-지정 돌연변이(site-directed mutagenesis)

[0098] 본 발명에 사용된 BV-PLA2 유전자 서열을 미리 pEcoli-Nterm 6xHN 벡터의 SalI-EcoRI 복제 부위에 삽입하였다. BV-PLA2 유전자 변이체의 구성은 하기의 프라이머 쌍으로 수행하였다: F-타입 BV-PLA2(forward): 5'-AAT GTC GAC CAA GTC GTT CTC GGA T-3'(서열번호 12); F-타입 BV-PLA2 (Reverse): 5'-AAG GAA TTC TTA TCA ATA CTT GCG-3'(서열번호 13); A-타입 BV-PLA2 (Forward): 5'-AAT GTC GAC ATA ATA TAT CCA GGA -3'(서열번호 14); A-타입 BV-PLA2 (Reverse): 5'-AAG GAA TTC TCA CAG TTT GTA ACA CTT-3'(서열번호 15); B-타입 BV-PLA2 (Forward): 5'-AAT GTC GAC CAA GTC GTT CTC GGA T-3'(서열번호 16); B-타입 BV-PLA2 (Reverse): 5'-AAG GAA TTC TCA CAG TTT GTA ACA CTT-3'(서열번호 17); C-타입 BV-PLA2 (Forward): 5'-AAT GTC GAC ATA ATA TAT CCA GGA-3'(서열번호 18); C-타입 BV-PLA2 (Reverse): 5'-AAG GAA TTC TTA TCA ATA CTT GCG-3'(서열번호 19). QuickChange 자리-지정 돌연변이 키트(Stratagene)를 사용하여 벡터 pEcoli-Nterm 6xHN 내에 BV-PLA2(H34Q)에 대한 유전자 변이체인 주형에 단일 변이를 도입하였다. 반응은 하기의 프라이머 쌍을 이용하여 수행하였다: PLA2-H34Q (Forward): 5'-GCA TGC TGT CGA ACC CAA GAC ATG TGC CCG GAC G-3'(서열번호 20); PLA2-H34Q (Reverse): 5'-CGT CCG GGC ACA TGT CTT GGG TTC GAC AGC ATG C-3'(서열번호 21). 치환된 염기는 굵은 글씨체로 표기하였다. 돌연변이체의 뉴클레오티드 서열의 유효성은 DNA 서열분석으로 확인하였다.

[0099] 실시예 16: CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 조절 T 세포의 측정

[0100] 하기의 방법으로 준비된 시료에 대해 유세포 분석을 수행하여 각각의 세포에 대한 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 조절 T 세포의 비율을 측정하였다.

[0101] 16.1. 마우스 지라세포로부터 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 조절 T 세포의 측정

[0102] 6 내지 8주령의 암컷 C57BL/6^{Foxp3-EGFP} 마우스로부터 지라를 수득하였다. RPMI 1640 배지에서 유리 슬라이드를 이용하여 지라를 파쇄하여 지라세포를 제조하였고, 이후 세포를 RPMI 1640 배지로 세척하고 이어 적혈구 용해 완충액(Pharmingen)으로 세척하였다. 항-마우스 CD3 항체(2.5 mg/ml)로 바닥이 평평한 48-웰 플레이트를 4℃에서 밤새 코팅하였다. 상기 48-웰 플레이트에 4×10⁶ 세포/ml의 세포밀도로 지라세포를 분주하고 2 mg/ml 항-마우스 CD28 항체로 선처리한 후, PBS, PLA2 또는 재조합 PLA2로 3일 및 7일간 처리하였다. 3일 및 7일간 재조합 PLA2로 처리 후 지라세포의 단일-세포 부유액을 표준 염색법을 이용하여 항-CD4-APC 및 항-CD25-PE 단클론 항체와 함께 인큐베이션하였고, 염색된 시료는 유세포분석기(FACScan Calibur, BD Biosciences)로 분석하였다. 데이터의 수집 및 분석은 Cell Quest 3.0f 소프트웨어를 사용하여 수행하였다.

[0103] 16.2. 마우스 CD4⁺ T 세포로부터 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 조절 T 세포의 측정

[0104] MACS CD4(L3T4) MicroBeads(Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA, USA)를 이용하여 마우스 CD4⁺ T 세포를 지라로부터 분리하였다. 제조된 단일-세포 부유형 세포를 CD4(L3T4) MicroBeads와 혼합하고 4℃에서 15분간 인큐베이션시켰다.

[0105] 인큐베이션 후, 세포를 MACS 완충액으로 세척하고 적은 부피로 재현탁시켰다. 세포를 VarioMACS 자성 분리기에 장착된 LS 컬럼을 통과시켰다. 서너번 세척하여 CD4⁺ 세포를 회수하고 완전 RPMI 1640 배지에 재현탁시켰다. 항-마우스 CD3 항체(2.5 mg/ml)로 바닥이 평평한 48-웰 플레이트를 4℃에서 밤새 코팅하였다. CD4⁺ 세포를 상기

48-웰 플레이트에 1×10^6 세포/ml의 세포밀도로 분주하고 상기 16.1.과 동일한 방법으로 처리하여 유세포분석을 수행하였다.

[0106] 실시예 17: 통계분석

[0107] 데이터의 통계 분석은 프리즘 5.01 소프트웨어(Graph Pad Software Inc., CA, USA)를 사용하여 수행하였다. 모든 수치는 평균 $\pm$ S.E.M(평균치 표준오차)으로 표기하였다. 대조군과 시료처리군의 평균 값의 차이는 일방(one-way) ANOVA 또는 스튜던트 t 테스트에 의해 결정되었다. 모든 실험에서, $p < 0.05$ 는 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

[0108] 실험결과

[0109] 실험예 1: 봉독에 의한 시험관 내 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg의 직접적인 증가

[0110] 실시예 6.1에서 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg 군집 및 $CD4^+CD25^+$ Treg에서 Foxp3의 발현을 시험관 내 면역형광염색법을 사용하여 분석하였다. 시험관 내에서 지라세포에 다양한 농도의 봉독(0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 및 10 μ g/ml)을 처리하여 농도에 따른 영향을 관찰하였다(도 2A 및 2B). 봉독(1 μ g/ml)은 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg($P < 0.05$)를 눈에 띄게 증가시켰고 $CD4^+CD25^+$ Treg에서 Foxp3의 발현도 향상시켰다($P < 0.001$). 지라세포에 첨가된 봉독은 직접적으로 또는 항원 제시 세포(antigen presenting cell; APC)를 통해 $CD4^+$ T 세포에 영향을 미칠 수 있다(presumably). 봉독이 $CD4^+$ T 세포에 직접적으로 작용하는지를 결정하기 위해, $CD4^+$ T 세포를 분리하여 1 μ g/ml 봉독으로 처리하였다(도 2C). $CD4^+$ T 세포를 APC 없이 배양하였을 때, $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg가 증가되었다($P < 0.001$). 이어서, 봉독이 $CD4^+CD25^-$ T 세포를 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg로 전환시키는지를 확인하였다. $CD4^+CD25^-$ T 세포에 봉독을 가하였을 때, Treg는 증가하지 않은 반면(도 2D), Foxp3 발현은 봉독을 처리하여 단독으로 배양한 $CD4^+CD25^+$ Treg에서 눈에 띄게 향상되었다(도 2E, $P < 0.001$). 상기 결과는 봉독이 $CD4^+CD25^-$ T 세포로부터 Treg 유도를 통해서가 아니라 $CD4^+CD25^+$ Treg에 직접적인 영향을 통해 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg를 증가시킴을 나타낸다.

[0111] 실험예 2: 봉독의 Treg의 특이적 증가효과 및 용량에 따른 생체 내 효율성

[0112] 생체 내 실험을 위한 최적의 용량을 결정하기 위해 마우스에 다양한 용량의 봉독(0, 0.01, 0.1, 1 및 10 mg/kg 체중)을 5일간 매일 처리하였다. 다양한 용량을 사용하였음에도 불구하고, 1 mg/kg의 봉독으로 처리한 마우스에서만 $CD4^+CD25^+$ Treg 수준이 식염수-처리 대조군에 비해 현저히 증가하였다(도 3A, $P < 0.001$). $CD4^+CD25^+$ Treg에서 Foxp3 발현은 시험관 내에서의와 같이 눈에 띄게 증가하였다(도 3B, $P < 0.05$). 이후, $CD4^+$ T 세포, $CD8^+$ T 세포 및 B 세포를 포함하는 다른 면역세포에 대한 봉독(1 mg/kg)의 효과를 분석하였다. 식염수-처리 대조군에 비해 $CD4^+$ T 세포, $CD8^+$ T 세포 및 B 세포에서 유의한 변화는 없는 반면 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg는 현저히 증가하였다(도 3C 및 3D). 상기 결과는 봉독의 용량이 그 효율성에 있어서 중요한 요소이며, 1 mg/kg의 용량이 면역 치료를 위한 최적의 용량일 수 있다.

[0113] 실험예 3: 봉독의 시험관 내 미엘린(myelin)-특이적 증식 억제효과

[0114] 상기 설명된 실험의 결과는 봉독이 자가면역 질환의 치료에 있어서 잠재적인 치료제로서의 사용 가능성을 가짐을 나타낸다. 이를 확인하기 위하여, 먼저 항원-특이적 증식분석을 수행하였다(도 4). MOG₃₅₋₅₅ 면역화된 C57BL/6 마우스의 지라세포를 MOG₃₅₋₅₅ 펩타이드로 재자극시키고 72시간 후 세포를 계수하였다. 지라세포의 미엘린-특이적

증식은 농도 의존적 방식으로 봉독에 의해 억제됨을 확인하였다($P < 0.001$).

[0115] 실험예 4: C57BL/6 마우스에서 Th1/Th17 분화 억제를 통한 봉독의 EAE 완화

[0116] 봉독의 효과가 생체 내 실험으로 해석될 수 있는지 순차적으로 확인하였다. 첫 단계로서, MOG₃₅₋₅₅ 면역화된 C57BL/6 마우스를 0일부터 또는 14일부터 10일동안 매일 봉독(1 mg/kg)으로 처리하였다(도 5A 및 5B). 봉독은 식염수-처리 마우스와 비교하여 질환 중증도를 낮출 수 있었다. 상기 결과는 봉독이 MS(multiple sclerosis; 다발성 경화증)의 확립된 동물모델인 EAE에서 예방 및 치료효과가 있음을 나타낸다. MS 및 EAE가 Th1/Th17 반응을 통해 매개된다는 것이 이미 보고되었다. 이에 본 발명자들은 봉독이 Th1/Th17 분화를 저해할 수 있는지를 연구하였다. 24일에 EAE 유도된 마우스의 CD4⁺ T 세포를 시험하였다(도 5C). Th1($P < 0.05$) 및 Th17($P < 0.05$) 분화는 모두 봉독치리에 의해 유의적으로 차단되었다.

[0117] 또한, 감소된 Th1/Th17 분화가 사이토카인 생산에 영향을 미칠 수 있는지를 시험하기 위하여, 24일에 봉독-처리 마우스와 식염수-처리 마우스의 혈청 사이토카인 프로파일을 분석하였다(도 5D). 봉독치리는 혈청 내 IFN- γ ($P < 0.05$), IL-17A($P < 0.01$) 및 TNF($P < 0.05$) 및 IL-6($P < 0.05$)을 포함하는 다른 염증성 사이토카인 생산도 상당히 감소시켰다. 흥미롭게도 주된 Th2(IL-4 생산 CD4⁺ T 세포) 사이토카인인 IL-4 또한 감소되었다. 상기 결과는 봉독치료가 Th1/Th17 분화를 저해함을 나타낸다.

[0118] 실험예 5: 봉독의 EAE 완화효과와 CD4⁺CD25⁺ Treg의 관계

[0119] 실험예 1에서 봉독이 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg를 증가시킴을 보였다. 또한 실험예 4는 봉독이 Th1/Th17 분화 억제를 통해 EAE를 약화시킴을 제시하였다. 상기 결과는 봉독에 의한 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg의 증가가 Th1/Th17 분화를 차단하여 EAE를 개선시킴을 유추할 수 있다. 이러한 가설을 확증하기 위해, EAE의 봉독 처리하는 동시에 항-CD25 단클론항체로 Treg를 결핍시켰다. 이전의 연구 결과는 항-CD25 단클론항체가 마우스에서 CD4⁺CD25⁺ Treg 결핍에 적합하며, 본 발명의 대부분의 CD4⁺CD25⁺ T 세포는 Foxp3에 대해 양성을 나타내어 Treg로 판단할 수 있다. 또한 본 발명자들은 EAE의 질환 경과 및 사이토카인 생산을 포함한 Th1/Th17 분화를 분석하였다(도 6). 그 결과, 임상 점수, Th1/Th17 분화 또는 사이토카인 분비에서는 아무런 차이를 나타내지 않았다. 결론적으로, Treg 결핍은 EAE에 대한 봉독의 효과를 차단한다. 본 발명의 구체적인 실험예에 따르면, 마우스 시스템에서 봉독 처리는 CD4⁺CD25⁺ Treg에 대한 직접적인 효과를 통해 EAE를 약화시킨다.

[0120] 실험예 6: 봉독의 인간 Treg 및 Th1/Th17 분화에 대한 영향

[0121] 추가적으로 상기 봉독의 효과가 인간에서 발생할 수 있는지를 확인하였다. Treg 수준이 증가되는지를 결정하기 위해, 건강한 공여자로부터 신선하게 분리한 PBMC를 1 μ g/ml의 봉독 또는 PBS와 함께 24시간 동안 배양하였다(도 7A). 봉독처리한 4개 대상 중 3개에서 CD4⁺Foxp3⁺ Treg가 증가한 반면(51.19 $\pm$ 17.94% 증가 vs. PBS) 나머지 하나의 대상에서 봉독치리는 약한 CD4⁺Foxp3⁺ Treg 감소를 야기하였다(5.16% 감소 vs. PBS). 별도로, Th1/Th17 분화를 검출하기 위해 PBMC를 1 μ g/ml의 봉독 및 항-CD3/28 항체로 처리하였다(도 7B). 흥미롭게도 Treg에서 증가를 보인 3개의 대상은 감소된 Th1(34.96 $\pm$ 4.93% 감소 vs. PBS) 및 Th17(26.29 $\pm$ 8.08% 감소 vs. PBS) 비율을 나타내었으나 약한 Treg 감소를 보인 대상은 감소된 Th1(9.71% 증가 vs. PBS) 및 Th17(1.14% 증가 vs. PBS)을 나타내지 않았다. 상기 데이터는 봉독이 인간에서 Treg의 억제 기능을 강화하고 상기 효과는 개별적으로 적용될 수 있음을 나타낸다.

[0122] 실험예 7: 마우스 및 인간의 면역-조절에 대한 봉독의 유효성분으로서의 BV-PLA2

[0123] Apis mellifera의 봉독은 펠리틴, BV-PLA2, MCD, 아파민을 포함하는 다양한 펩타이드 및 단백질을 포함한다. 이에 본 발명자들은 상기 다양한 봉독의 성분 중 어떠한 성분이 마우스에서 Treg에 영향을 미치는지 시험하였다.

특히, 봉독 또는 멜리틴, BV-PLA2, 아파민 및 MCD를 포함하는 각각의 성분을 Foxp3^{EGFP} C57BL/6 마우스로부터 분리한 지라세포에 처리하였다(도 8). 봉독($P<0.05$) 및 BV-PLA2($P<0.01$)는 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg에서 눈에 띄는 증가를 유도하였으나, 다른 화합물은 그렇지 못하였다. 따라서, 본 발명자들은 면역-조절에 있어서 BV-PLA2가 봉독의 유효성분임을 확인하였다. 또한 인간에서 상기 면역-억제 효과를 측정하였다. 이를 위해, 신선하게 분리된 PBMC를 봉독, BV-PLA2 또는 PBS 및 항-CD3/28 항체로 처리하였다(도 9). 봉독 및 BV-PLA2는 Th1(봉독: $30.45 \pm 10.39\%$, BV-PLA2: $23.93 \pm 6.71\%$ 감소 vs. PBS) 및 Th17(봉독: $66.04 \pm 4.06\%$, BV-PLA2: $61.80 \pm 5.25\%$ 감소 vs. PBS) 군집을 감소시키는 유사한 결과를 보였다. 결론적으로, 상기 결과는 BV-PLA2가 마우스 및 인간 모두에서 면역-조절 효과를 가짐을 나타낸다.

[0124] 실험예 8: 시험관 내 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg 및 지라세포의 염증성 사이토카인에 대한 BV-PLA2의 영향

[0125] CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg 군집은 식염수 처리군에 비해 BV-PLA2 처리군에서 증가하였다. 그리고, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg의 백분율 또한 식염수 처리군에 비해 BV-PLA2 처리군에서 눈에 띄게 증가하였다(도 10). Th2에 의해 B 세포 생성을 활성화하는 Th1 사이토카인인 IL-2 수준은 식염수 처리군의 배양 상등액에 비해 BV-PLA2 처리군의 배양 상등액에서 현저하게 감소하였다. 상기 감소된 IL-2 수준은 BV-PLA2가 B 세포 면역 반응에 의한 염증을 억제할 수 있음을 나타낸다. Treg 사이토카인의 일종인 IL-10 수준은 식염수 처리군에 비해 BV-PLA2 처리군에서 확실히 증가하였으나 상기 BV-PLA2는 IL-4, IL-6, INF- γ , 및 TNF에는 통계적으로 유의한 영향을 미치지 않았다(도 11).

[0126] 실험예 9: OVA-유도 천식군에서 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg에 대한 BV-PLA2의 영향

[0127] OVA-유도 천식 마우스모델로부터 분리한 폐포세포에서, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg 군집은 CON 그룹에 비해 OVA 그룹에서 감소하였다. 한편, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg 군집은 OVA 그룹에 비해 OVA+PLA2 그룹에서 증가하였다. 상기 결과는 BV-PLA2가 알레르기성 천식에서 감소된 Treg를 향상시킬 수 있음을 나타낸다(도 12).

[0128] 실험예 10: BALF에서 Th2 사이토카인(IL-4 및 IL-13)에 대한 BV-PLA2의 영향

[0129] 대조군 및 각각의 실험군 마우스모델의 BALF에서 사이토카인 수준을 측정하였다. 그 결과, Th2 염증성 사이토카인은 OVA+PLA2 그룹 및 대조군에 비해 OVA, OVA-T 및 OVA-T+PLA2 그룹에서 증가하였다(도 13). 이는 BV-PLA2가 OVA 처리에 의해 증가된 염증성 사이토카인의 생산을 감소시킬 수 있으나, Treg가 결핍된 군에서는 BV-PLA2 처리시에도 상기 억제효과를 나타내지 못하였다. 이는 BV-PLA2에 의한 염증성 사이토카인 분비 억제에 Treg가 관여함을 나타낸다.

[0130] 실험예 11: 혈청 중 IgE 역가에 대한 BV-PLA2의 영향

[0131] 혈청 중 IgE 농도는 CON 그룹에 비해 OVA 그룹에서 눈에 띄게 증가하였다. 이는 실시예 1.2에 의한 본 발명의 동물모델에서 천식 유도가 성공적으로 이루어졌음을 나타낸다. 혈청 IgE 농도는 OVA, OVA-T 및 OVA-T+PLA2 그룹에 비해 OVA+PLA2 그룹에서 현저히 감소하였다. BV-PLA2가 OVA-유도 알레르기성 천식 마우스에서 혈청 IgE 농도의 증가를 억제할 수 있었으나 상기 BV-PLA2의 효과는 Treg 결핍군에서는 나타나지 않았다(도 14). 이는 상기 BV-PLA2의 혈청 IgE 농도 증가 억제효과가 Treg 활성화를 통해서 일어남을 제시한다.

[0132] 실험예 12: BAL에서 총 세포 및 염증성 세포에 대한 BV-PLA2의 영향

[0133] 총 세포, 호산구 및 림프구는 CON 그룹에 비해 OVA 그룹에서 현저히 증가하였다. 이는 실시예 1.2에 의한 본 발명의 동물모델에서 천식 유도가 성공적으로 이루어졌음을 나타낸다. 총 세포, 호산구 및 림프구는 OVA, OVA-T 및 OVA-T+PLA2 그룹에 비해 OVA+PLA2 그룹에서 현저히 감소하였다. BV-PLA2가 OVA-유도 알레르기성 천식 마우스에서 총 BAL 세포, 및 호산구, 림프구 등 염증성 세포의 증가를 억제할 수 있었으나 상기 BV-PLA2의 효과는

Treg 결핍군에서는 나타나지 않았다(도 15). 이는 상기 BV-PLA2의 총 세포, 및 염증성 세포 증가 억제 효과가 Treg 활성화를 통해서 일어남을 제시한다.

[0134] 실험예 13: OVA-유도 천식모델의 폐 형태 변화에 대한 BV-PLA2의 영향

[0135] 천식의 조직학적 특성에 대한 PLA2의 영향을 분석하기 위하여 OVA-유도 알레르기성 천식 동물모델의 폐조직에 대한 H&E 및 PAS 염색을 수행하였다. OVA에 노출된 마우스로부터의 폐 조직의 조직절편은 기도염증을 나타내고, 폐의 기관지주위 영역에서 호산구 침윤이 확인되었다(도 16). 반대로, BV-PLA2로 처리한 마우스로부터 획득한 폐 조직의 조직절편에서는 기도염증이 감소하였다. 기관지 기도 주위에 있는 과요오드산 쉬프(PAS)-양성 점액-계수 술잔세포가 OVA, OVA-T 및 OVA-T+PLA2 그룹에서 검출되었다. 한편, BV-PLA2 처리는 기관지 기도 주위에 있는 PAS-양성 술잔세포를 상당히 감소시켰다(도 17). 이러한 발견은 BV-PLA2가 효과적인 기도 재형성의 가능성을 가짐을 나타낸다.

[0136] 실험예 14: OVA-유도 천식모델의 기도과민성에 대한 BV-PLA2의 영향

[0137] 기도 과민성에 대한 BV-PLA2의 억제효과를 확인하기 위해 P_{enh} 값을 측정하였다. 50 및 100 mg/ml 농도의 메타콜린에서 BV-PLA2 그룹에 비해 OVA, OVA-T 및 OVA-T+PLA2 그룹에서 P_{enh} 값이 눈에 띄게 증가하였다. 한편 BV-PLA2를 처리한 그룹은 50 및 100 mg/ml 농도의 메타콜린에서 OVA-유도 천식 마우스의 CON 그룹에 대해 증가된 P_{enh} 값을 감소시켰다(* $P<0.05$, ** $P<0.01$; 도 18).

[0138] 실험예 15: BV-PLA2의 파킨슨병 동물모델에서 SN(흑색질; substantia nigra)에서 DA(도파민성; dopaminergic) 뉴런 보호효과

[0139] MPTP 중독 후 7일에 상기 실시예 1.3에서 제조한 MPTP 유도 파킨슨병 동물모델의 뇌절편을 준비하여, DA 뉴런에 대하여 항-TH 항체로 면역염색하였다. BV-PLA2 처리는 MPTP-중독 대조군 마우스에 비해 SN에서 TH⁺ 뉴런의 수를 32%로 눈에 띄게 증가시켰다($P<0.01$; 도 1).

[0140] MPTP 투여는 SN에서 CD4 양성 T 세포의 침윤 후 미세아교세포 활성화를 유도하였다. 최근 CD4⁺CD25⁺ Treg가 MPTP-유도 PD 모델에서 미세아교세포 반응을 억제함으로 신경세포보호를 매개하는 것이 밝혀졌다. BV-PLA2의 신경보호효과에 대한 Treg의 관여를 확인하기 위해, MPTP 투여 전 1일에 항-CD25 항체를 복강내 주사(1 mg/kg)하여 MPTP-중독 마우스에서 Treg 세포를 감소시켰다. MPTP-중독 마우스에 비해 Treg 세포-감소 마우스에서 DA 신경세포사의 악화가 관찰되었다. Treg 세포-감소 마우스에서 BV-PLA2 처리는 MPTP-중독 마우스에 비해 DA 신경세포사를 감소시키지 못하였다.

[0141] 실험예 16: 유전자 합성 및 구성

[0142] 본 발명에서 사용된 BV-PLA2는 봉독성분 중 약 10-20% 비중을 차지하는 것으로 재조합 BV-PLA2는 꿀벌(*Apis mellifera*)로부터 RNA를 추출 후 cDNA를 합성하고 BV-PLA2 특이적 프라이머를 이용하여 PCR 기법으로 증폭시켰다. 증폭된 유전자는 pEcoli-Nterm 6xHN 벡터에 *Sa*I와 *Eco*RI 제한효소부위에 복제하였다. E.coil strain DH5a에 재조합 플라스미드를 형질전환 시킨 후 배양하여 재조합 플라스미드 DNA를 추출하였다. 재조합 플라스미드 DNA를 서열분석을 통하여 재조합 BV-PLA2가 맞는지 검증하였다. 재조합 BV-PLA2의 특정 단백질을 대량생산하기 위하여 E.coil strain BL21에 형질전환하였다. 본 실험에 사용된 4가지 타입(F, A, B, C)의 BV-PLA2도 위의 실험방법과 동일하게 pEcoli-Nterm 6xHN 벡터에 복제하였다(도 20).

[0143] 실험예 17: 재조합 BV-PLA2의 정제 및 효소활성

[0144] 본 발명에서 제조된 여러가지 형태의 재조합 BV-PLA2는 위의 실험방법과 같이 추출하여 15% (w/v) 폴리아크릴아미드(polyacrylamide)를 사용한 SDS-PAGE에서 확인하였다. 그 결과로서, 천연(Naive) 분비형 BV-PLA2는 134 AA, F-타입 재조합 BV-PLA2는 201 AA, A-타입 재조합 BV-PLA2는 133 AA, B-타입 재조합 BV-PLA2는 166 AA, C-

타입 재조합 BV-PLA2는 168 AA 크기의 단백질을 확인하였다(도 21A; A-타입은 보이지 않음).

[0145] 상기 제조된 3가지 타입의 재조합 BV-PLA2 및 천연 BV-PLA2에 대하여 실시예 14.3.에 기재된 바와 같이 DOPC 기질을 사용하는 EnzCheck[®] 포스포리파아제 A₂ 분석 키트(Invitrogen)를 사용하여 효소활성을 분석하였다. 그 결과, 천연 BV-PLA2는 8 U/MW, F-타입 재조합 BV-PLA2는 2 U/MW, B-타입 재조합 BV-PLA2는 효소활성이 측정되지 않았다. 반면, C-타입 재조합 BV-PLA2는 양성 대조군인 천연 BV-PLA2의 효소활성과 같은 수준으로 측정되었다(도 21B).

실험예 18: CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 조절 T 세포에 대한 재조합 BV-PLA2의 효과

[0147] 재조합 BV-PLA2가 지라세포에서 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 조절 T 세포를 조절하는지를 측정하기 위하여 6 내지 8 주령 C57BL/6^{Foxp3-EGFP} 마우스로부터 지라를 얻은 후, 그 지라세포에 항-마우스 CD3 항체와 항-마우스 CD28 항체를 자극 후 1 mg/mL의 농도로 천연 BV-PLA2와 각각의 재조합 BV-PLA2를 3일간 처리하여 항-CD4-APC와 항-CD25-PE 단클론 항체로 염색한 후 유세포 분석기를 이용하여 측정하였다. 천연 BV-PLA2는 대조군(1.66%)에 비해 두 배 이상 증가하였고, F와 B는 대조군과 비교하였을 때 효과가 없었다. 반면 C-타입 재조합 BV-PLA2는 3.96%로 비장세포에서 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 조절 T 세포의 증가에 효과가 있음을 확인할 수 있었다(도 22).

[0148] 또한, 재조합 BV-PLA2가 CD4⁺ T 세포에서 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 조절 T 세포를 조절하는지를 측정하기 위하여 6 내지 8 주령 C57BL/6^{Foxp3-EGFP} 마우스로부터 지라를 얻은 후, MACS CD4 (L3T4) MicroBeads를 이용하여 상기 지라세포로부터 CD4⁺ T 세포만을 분리한 후 항-마우스 CD3 항체와 항-마우스 CD28 항체를 자극 후 1 mg/mL의 농도로 천연 BV-PLA2와 각각의 재조합 BV-PLA2를 3일간 처리하여 항-CD4-APC와 항-CD25-PE 단클론 항체로 염색한 후 유세포 분석기를 이용하여 측정하였다. 천연 BV-PLA2는 대조군(2%)에 비해 두 배 이상 증가하였고, F와 B는 대조군과 비교하였을 때 효과가 없었다. 반면 C-타입 재조합 BV-PLA2는 4%로 비장세포에서 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 조절 T 세포의 증가에 효과가 있음을 확인할 수 있었다(도 23).

실험예 19: C-타입 변이체(H34Q) 재조합 BV-PLA2의 제조 및 이의 효소활성

[0150] 본 발명에서 실시예 15에 기재된 방법으로 제조된 C-타입 변이체(H34Q) 재조합 BV-PLA2(서열번호 11)의 효소활성부위를 QuickChange 자리-지정 돌연변이 키트를 이용하여 히스티딘에서 글루타민으로 변형시킨 후 위의 실험 방법과 같이 추출하여 15% (w/v) 폴리아크릴아미드를 사용한 SDS-PAGE에서 확인하였다. C-타입 재조합 BV-PLA2와 C-타입 변이체(H34Q) 재조합 BV-PLA2의 단백질 크기인 171 AA를 SDS-PAGE 겔에서 확인하였다(도 24A).

[0151] 상기 제조된 C-타입 변이체(H34Q) 재조합 BV-PLA2의 효소활성을 측정하기 위하여 DOPC 기질을 사용하는 EnzCheck[®] 포스포리파아제 A₂ 분석 키트를 사용하였다. 측정결과, 천연 BV-PLA2는 8 U/MW, C-타입 변이체(H34Q) 재조합 BV-PLA2는 대조군인 천연 BV-PLA2의 효소활성과 같은 수준으로 측정되었다. 반면, C-타입 변이체(H34Q) 재조합 BV-PLA2의 효소활성은 낮은 수준으로 측정되었다(도 24B).

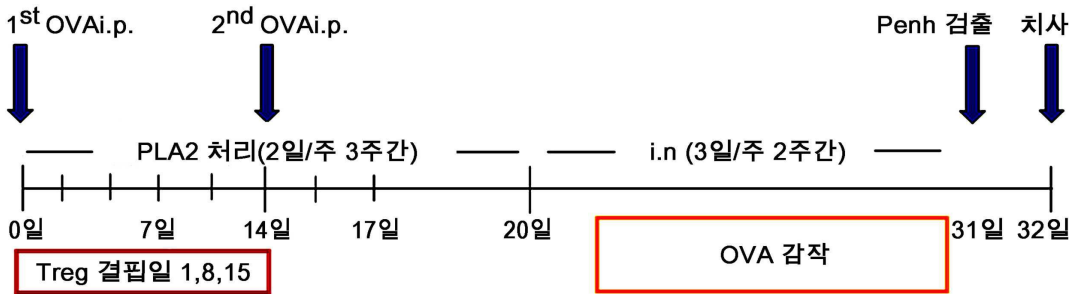
실험예 20: CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 조절 T 세포에 대한 C-타입 변이체(H34Q) 재조합 BV-PLA2의 효과

[0153] 상기 제조된 C-타입 변이체(H34Q) 재조합 BV-PLA2가 지라세포와 CD4⁺ T 세포에서 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 조절 T 세포를 조절하는지를 측정하기 위하여 6-8 주령 C57BL/6^{Foxp3-EGFP} 마우스로부터 지라를 얻은 후, 그 지라세포와 MACS CD4 (L3T4) MicroBeads를 이용하여 지라세포로부터 CD4⁺ T 세포만을 분리하여 얻은 시료에 각각 항-마우스 CD3 항체와 항-마우스 CD28 항체를 자극 후 1 mg/mL의 농도로 천연 BV-PLA2와 2 mg/mL의 농도의 C-타입 재조합 BV-PLA2 그리고 C-타입 변이체(H34Q) 재조합 BV-PLA2를 7일간 처리하여 항-CD4-APC와 항-CD25-PE 단클론 항체로 염색한 후 유세포 분석기를 이용하여 측정하였다. 비장세포에서는 대조군과 비교하였을 때 천연 BV-PLA2는 28%, C-타입 재조합 BV-PLA2는 각각 45%씩 증가하였고, 반면 C-타입 변이체(H34Q) 재조합 BV-PLA2는 대조군과 비교하였을 때

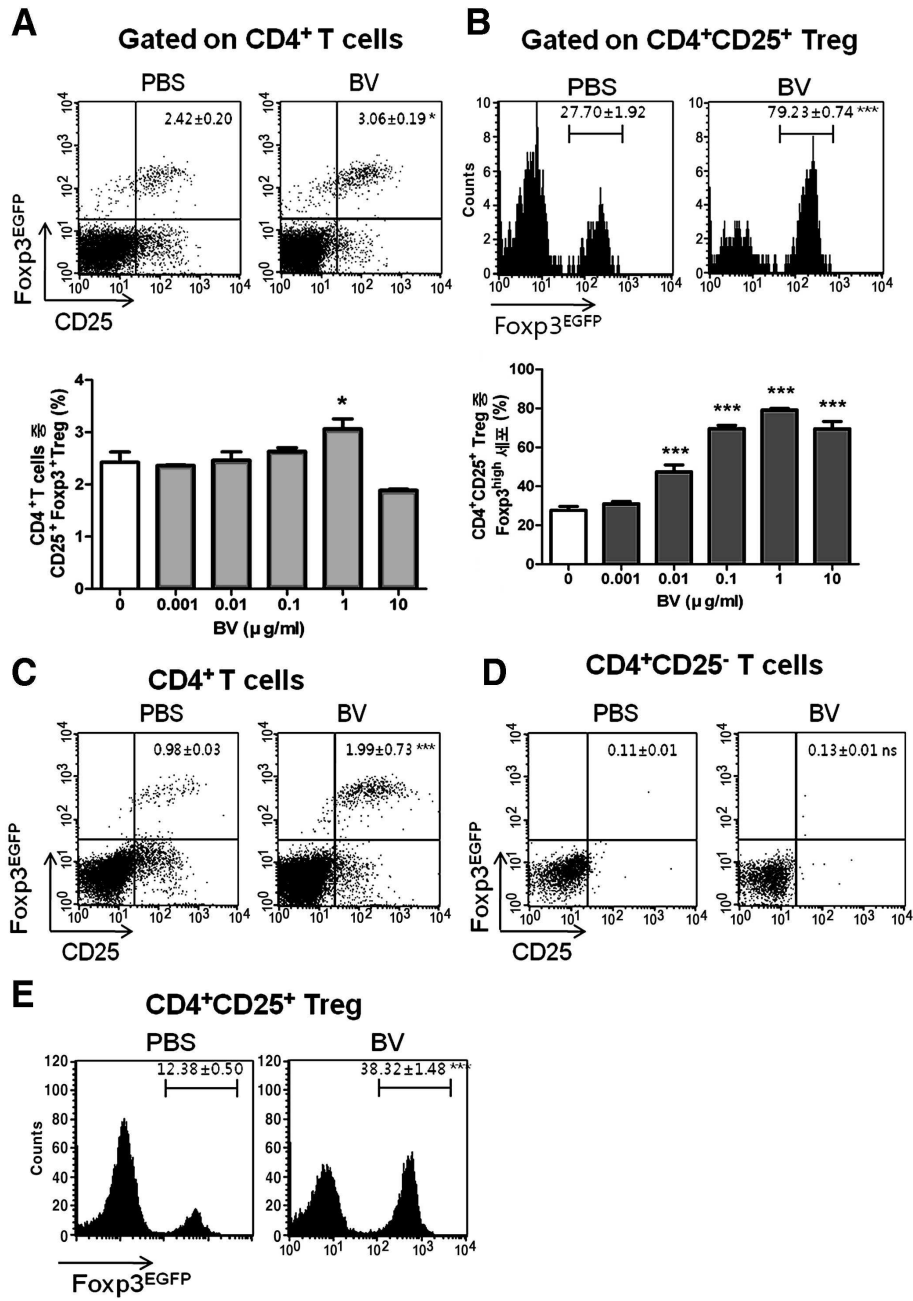
효과를 나타내지 않았다(도 25A). $CD4^{+}$ T 세포에서는 대조군과 비교하였을 때 천연 BV-PLA2는 7%, C-타입 재조합 BV-PLA2는 9%씩 각각 증가하였고, 반면 C-타입 변이체(H34Q) 재조합 BV-PLA2는 대조군과 비교하였을 때 $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$ 조절 T 세포의 증가에 효과를 나타내지 않았다(도 25B).

도면

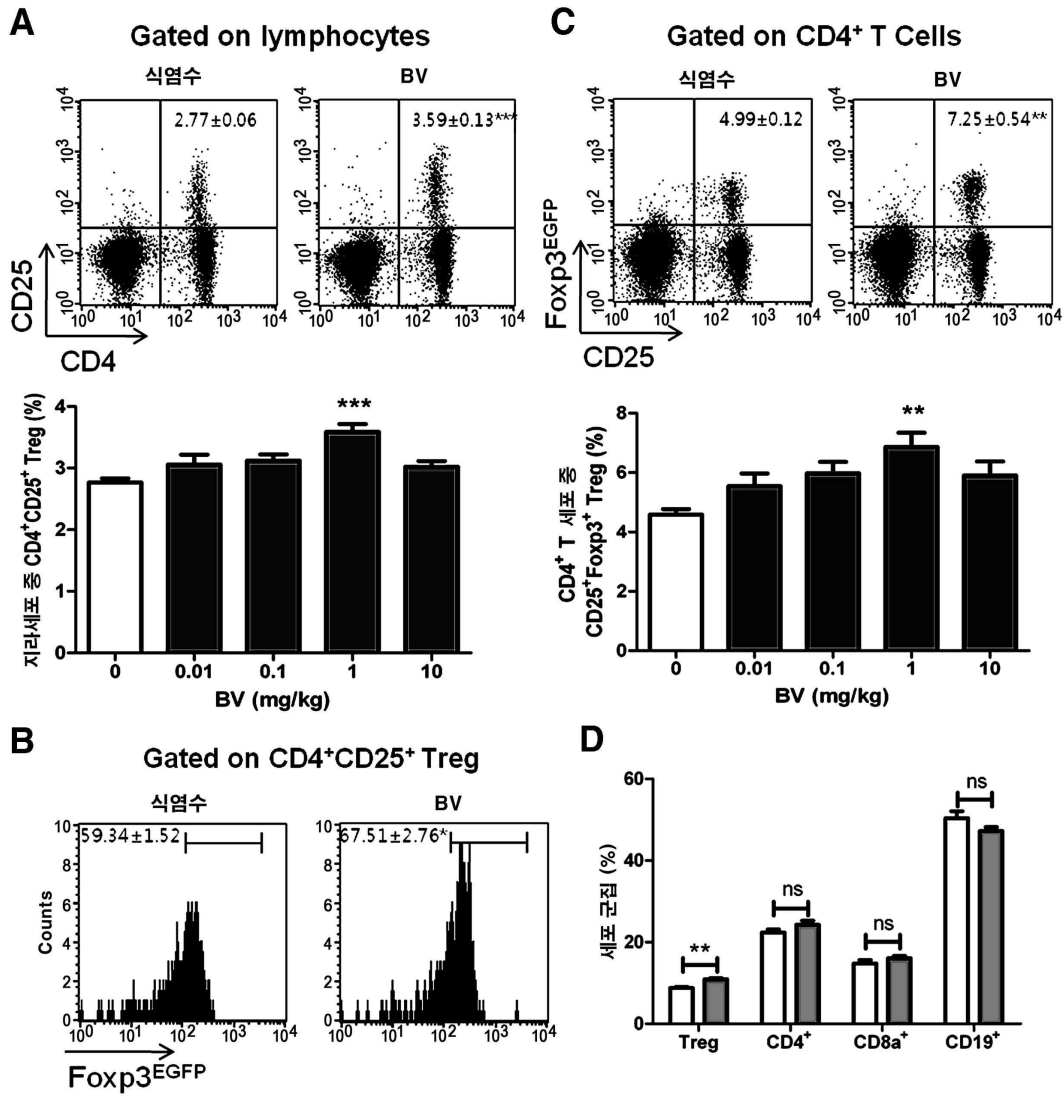
도면1



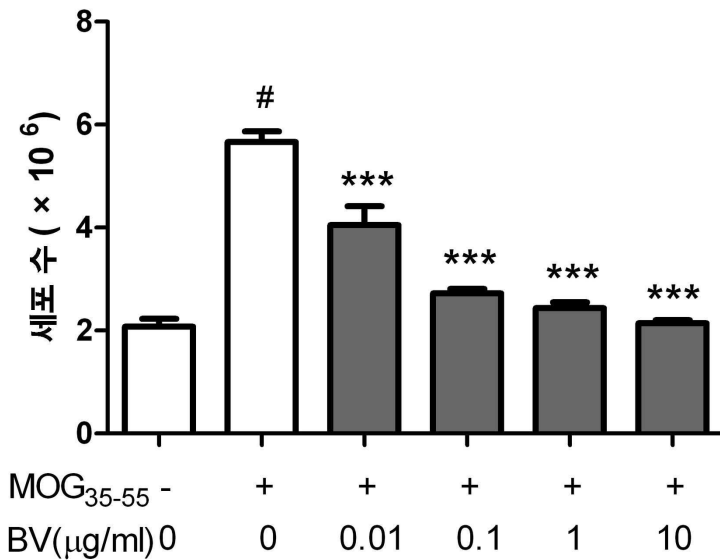
도면2



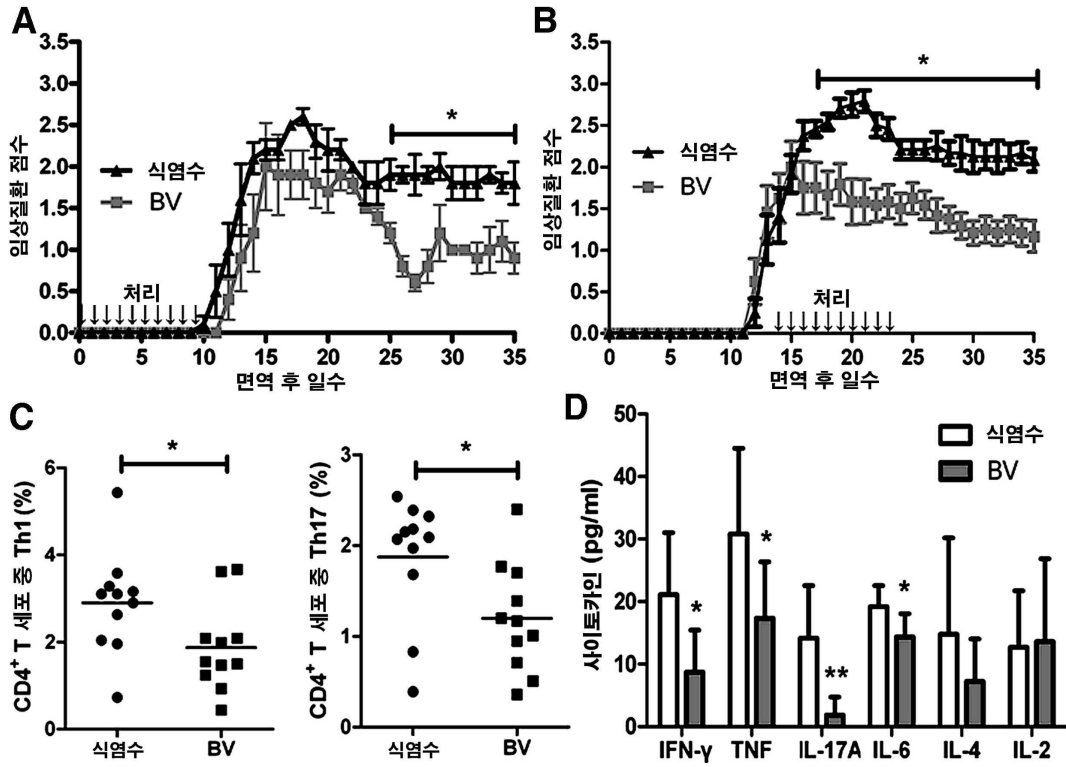
도면3



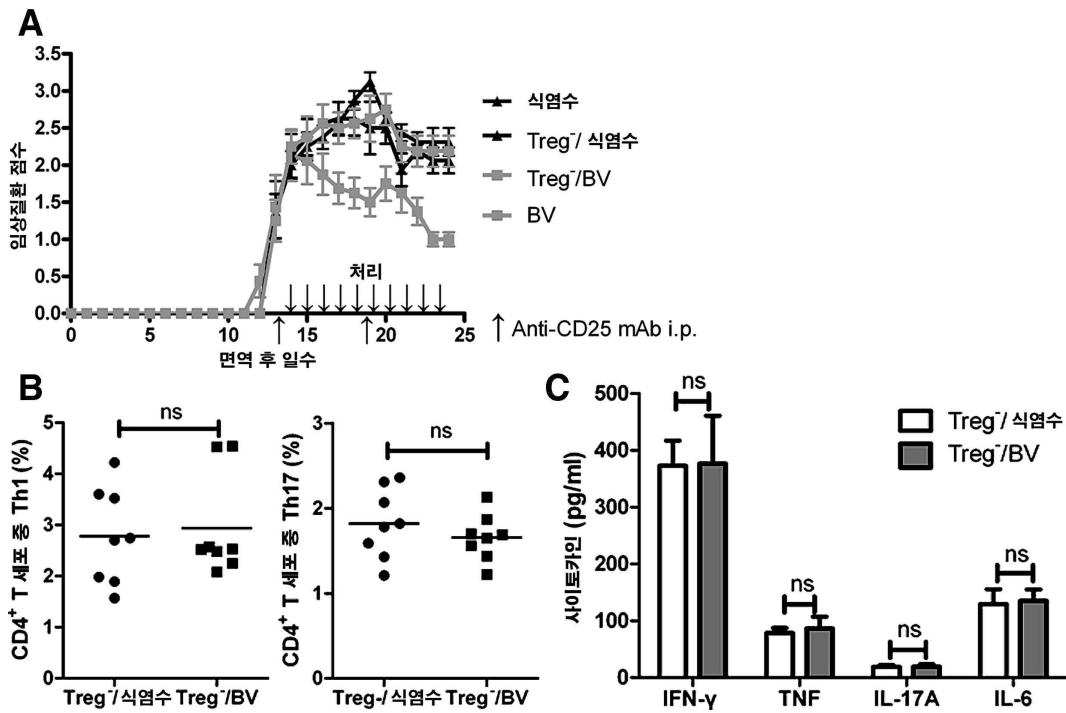
도면4



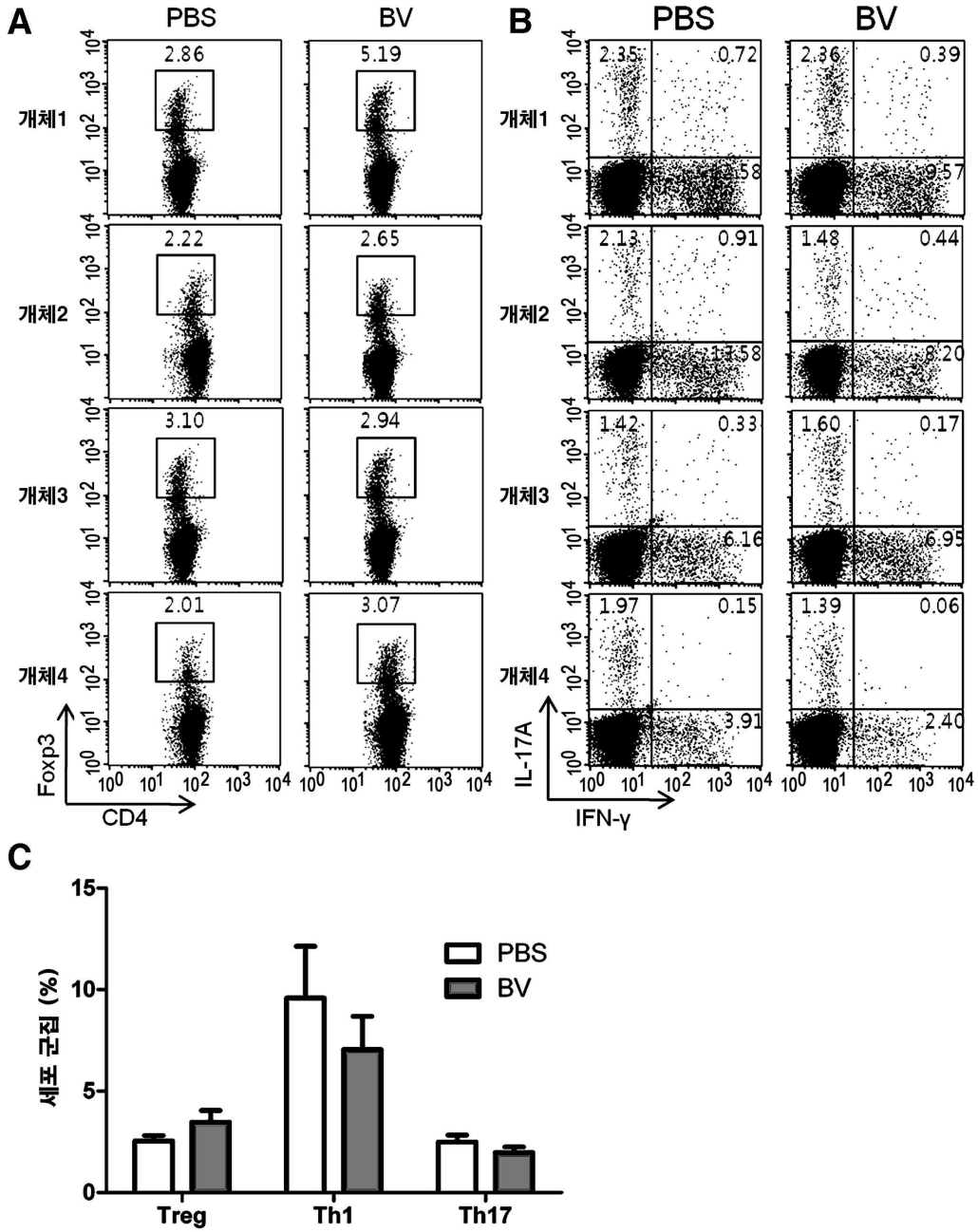
도면5



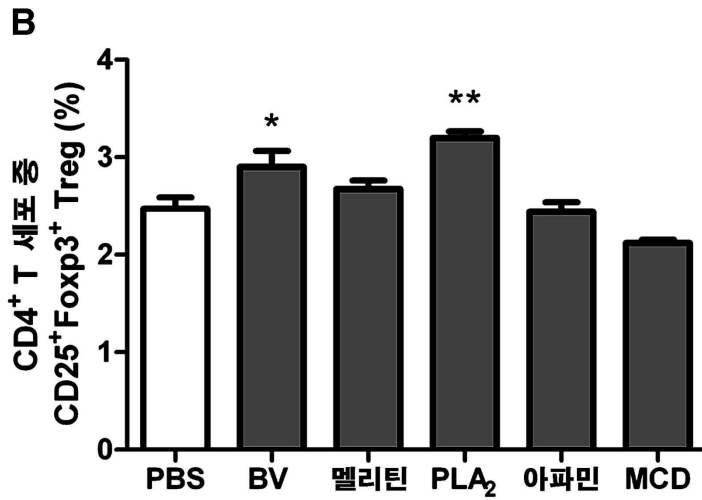
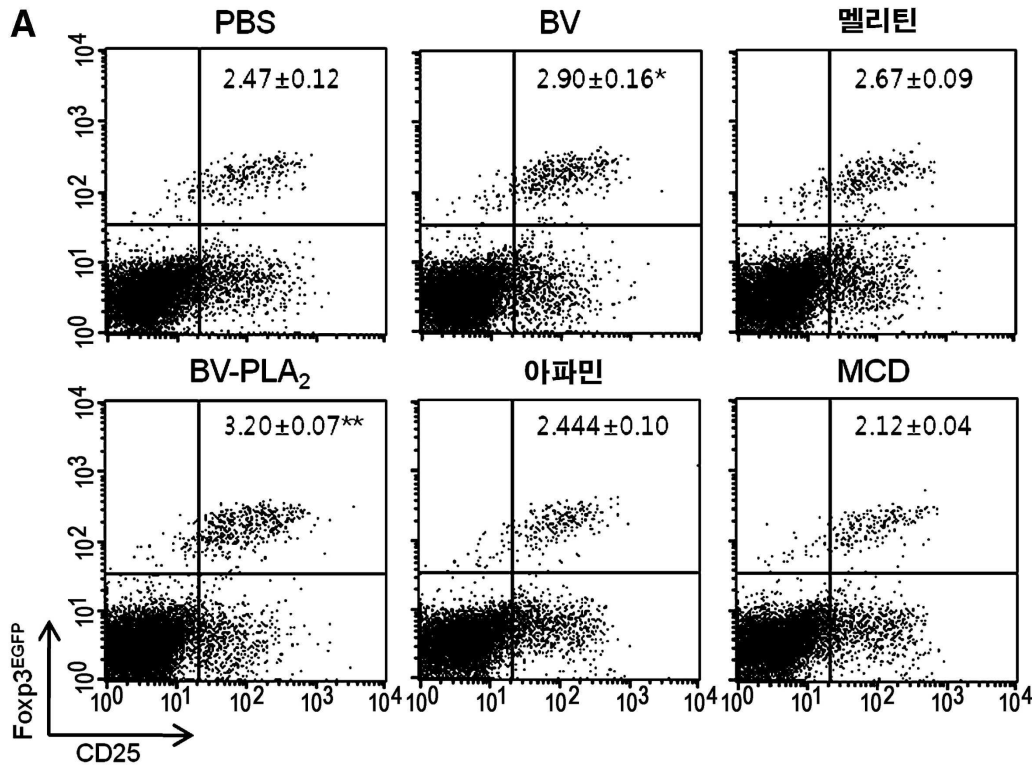
도면6



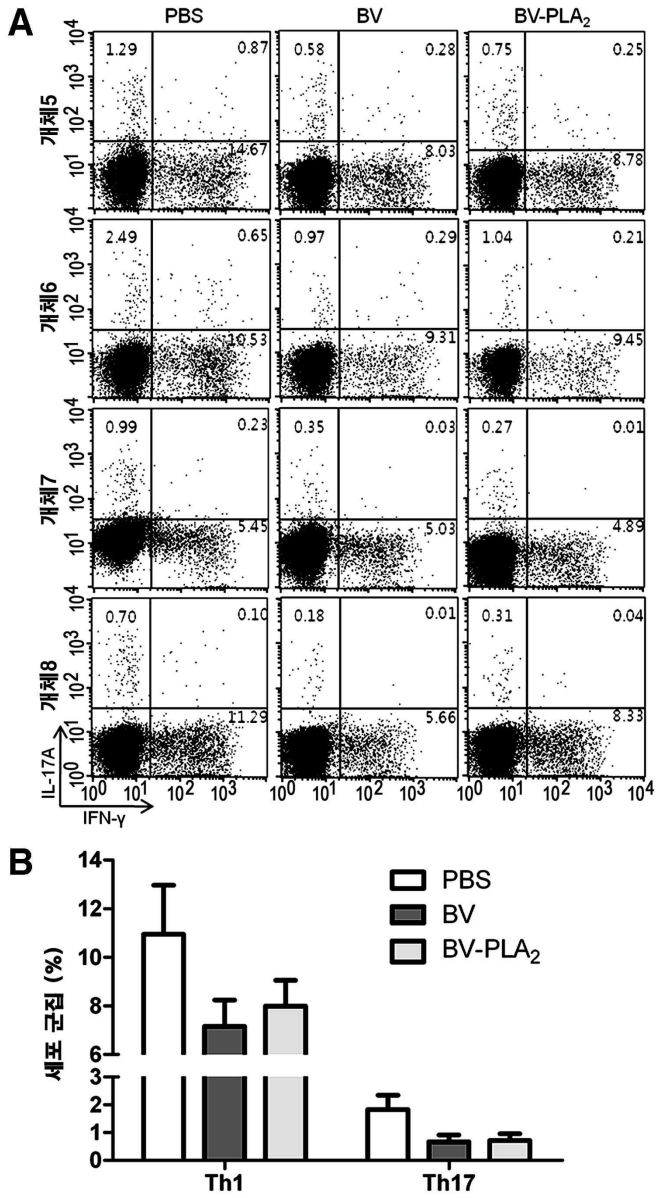
도면7



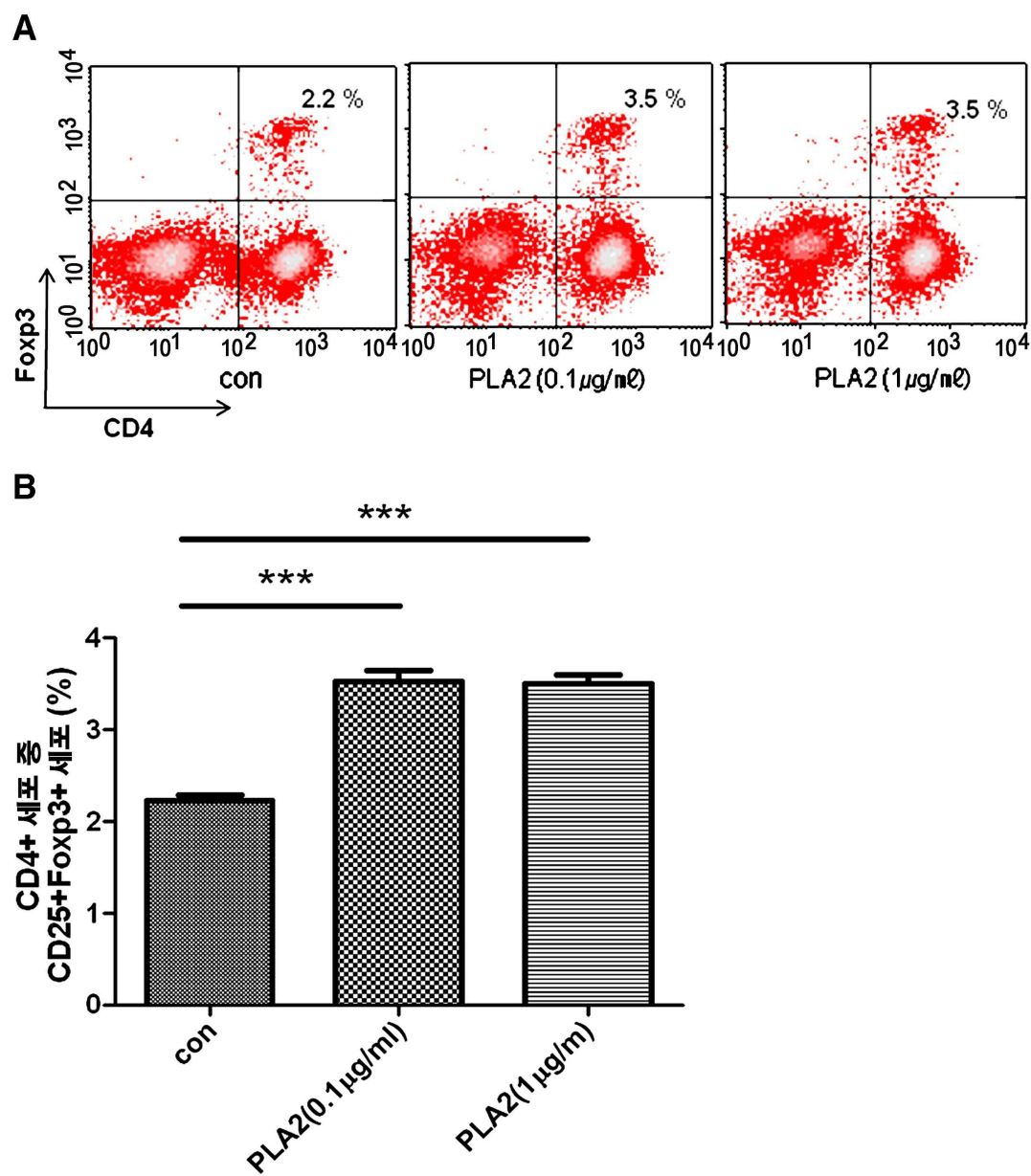
도면8



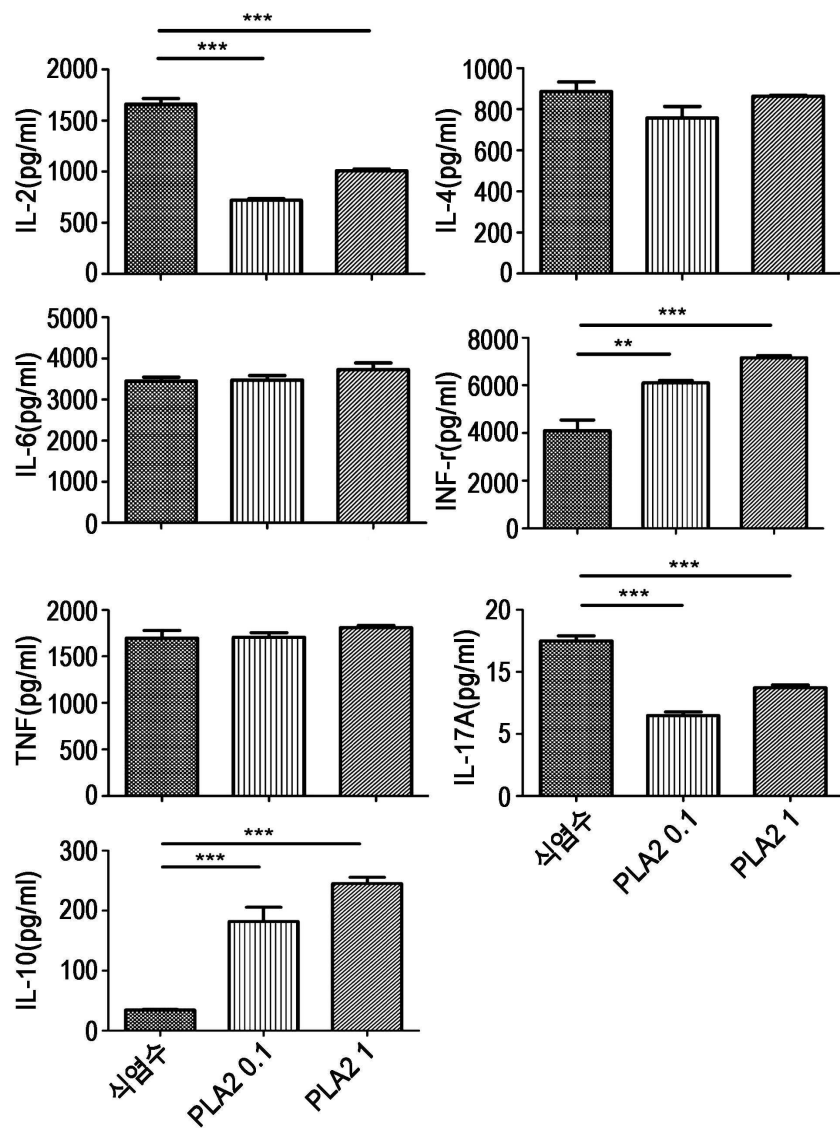
도면9



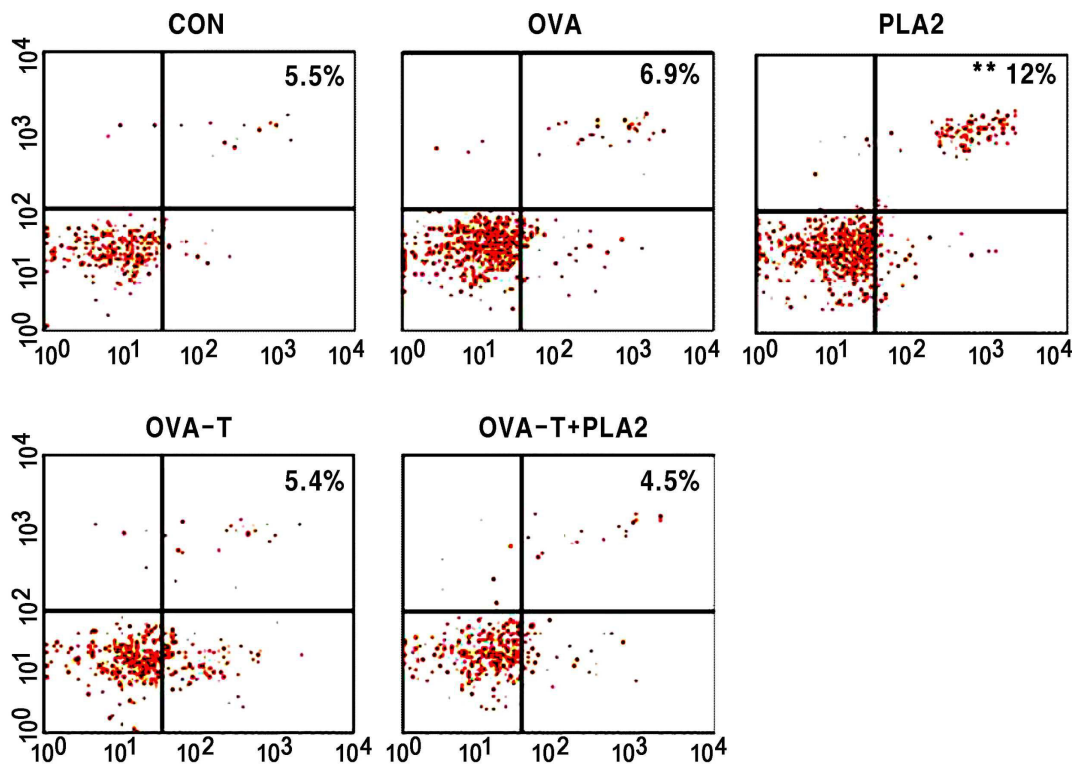
도면10



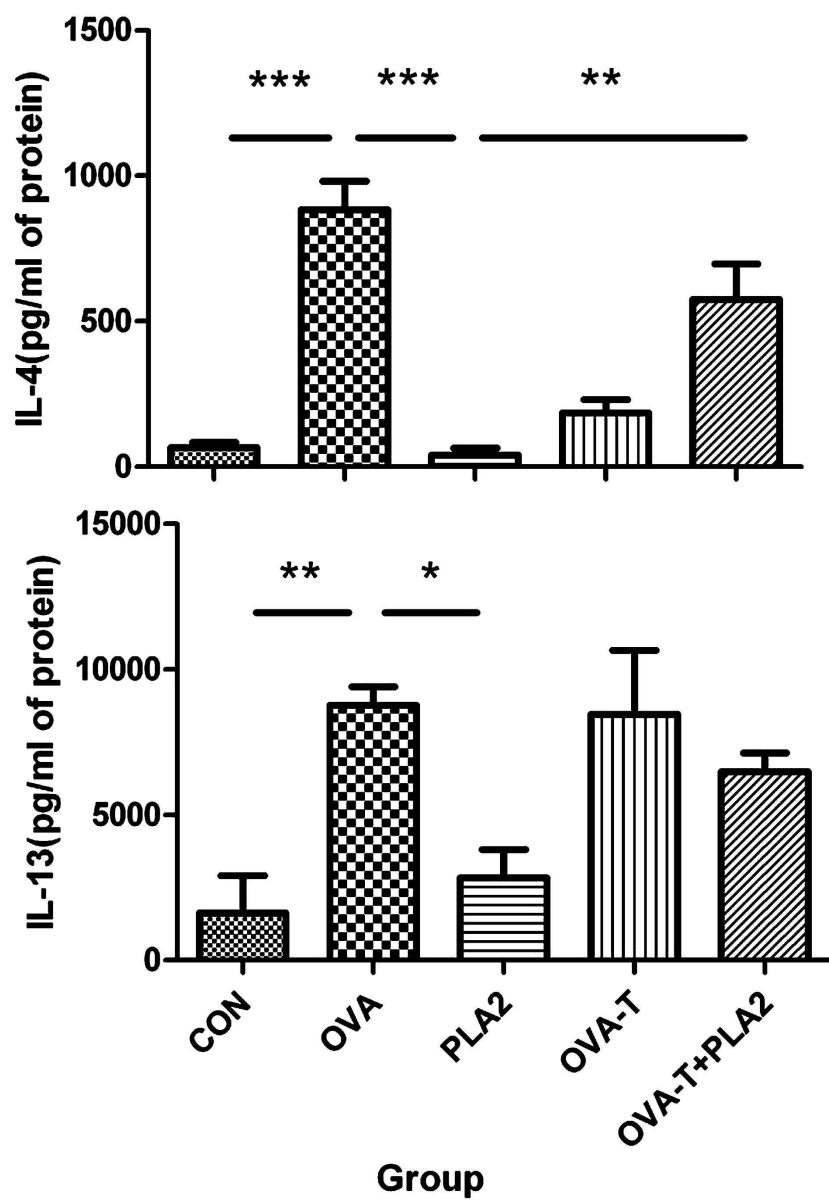
도면11



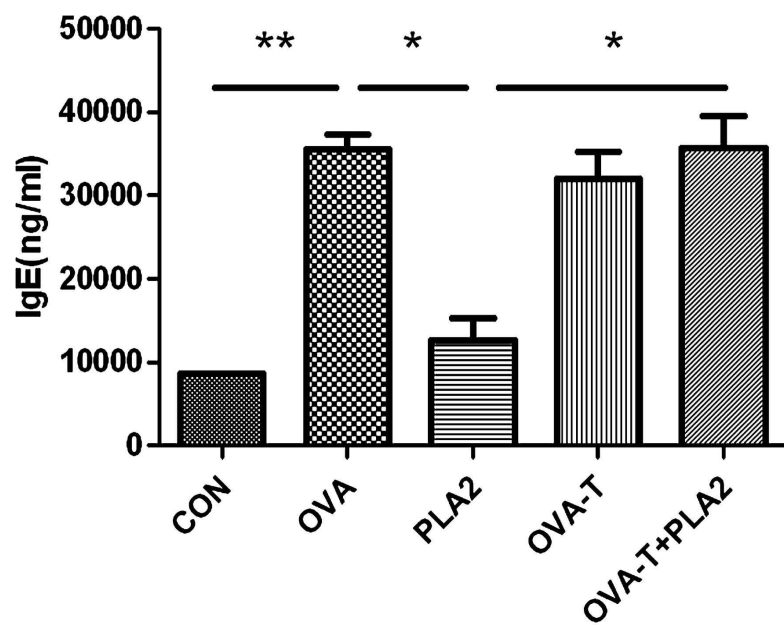
도면12



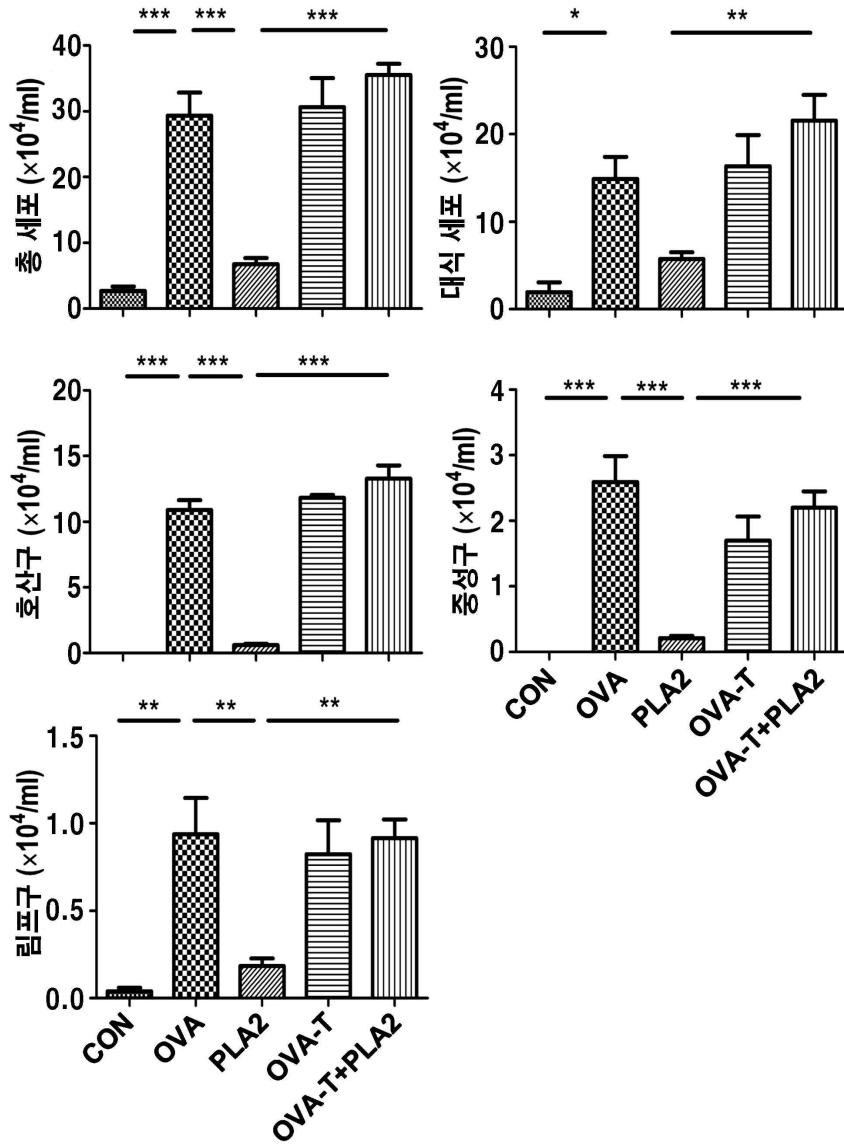
도면13



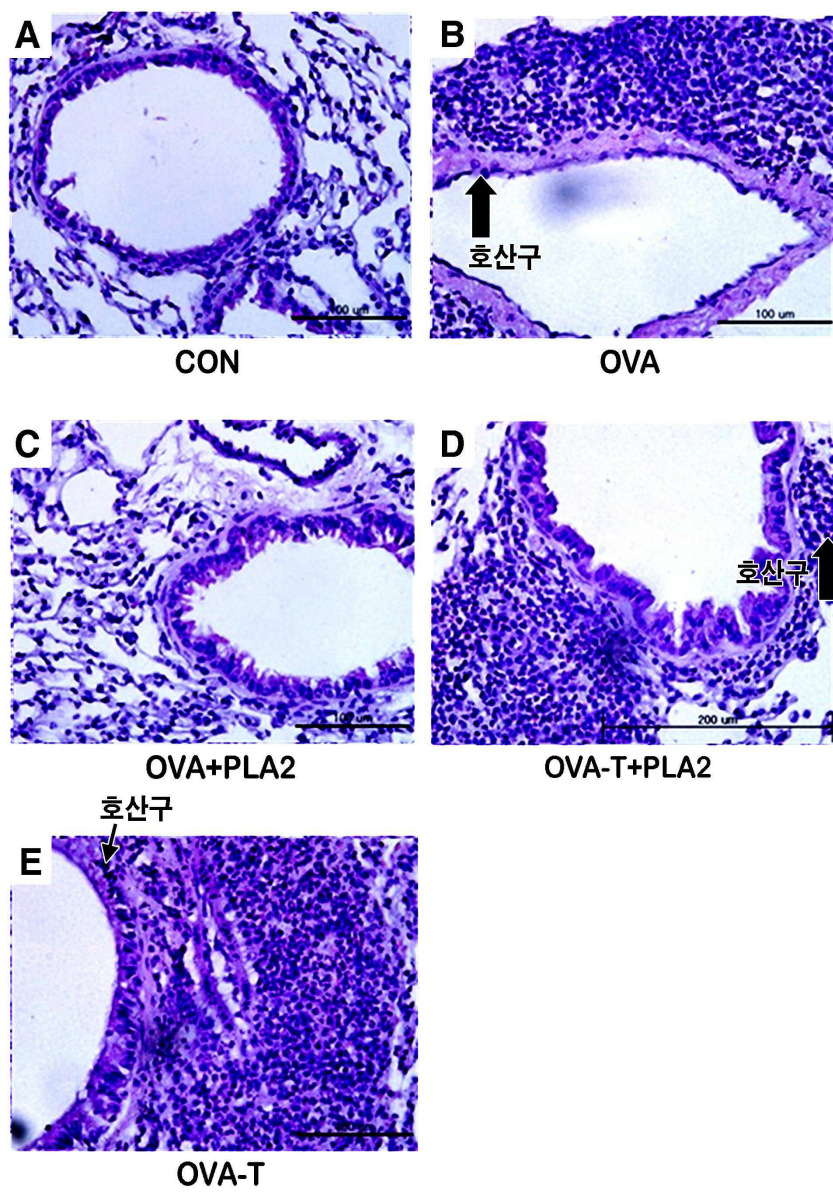
도면14



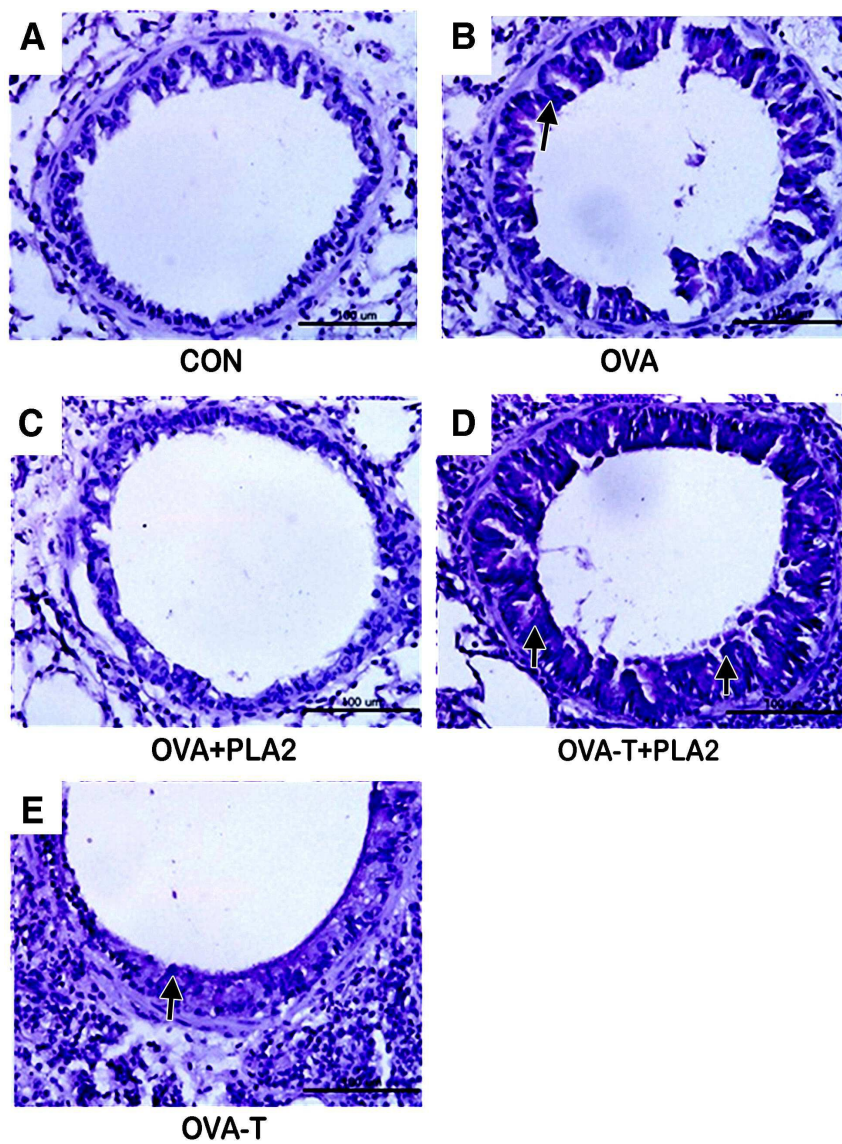
도면15



도면16

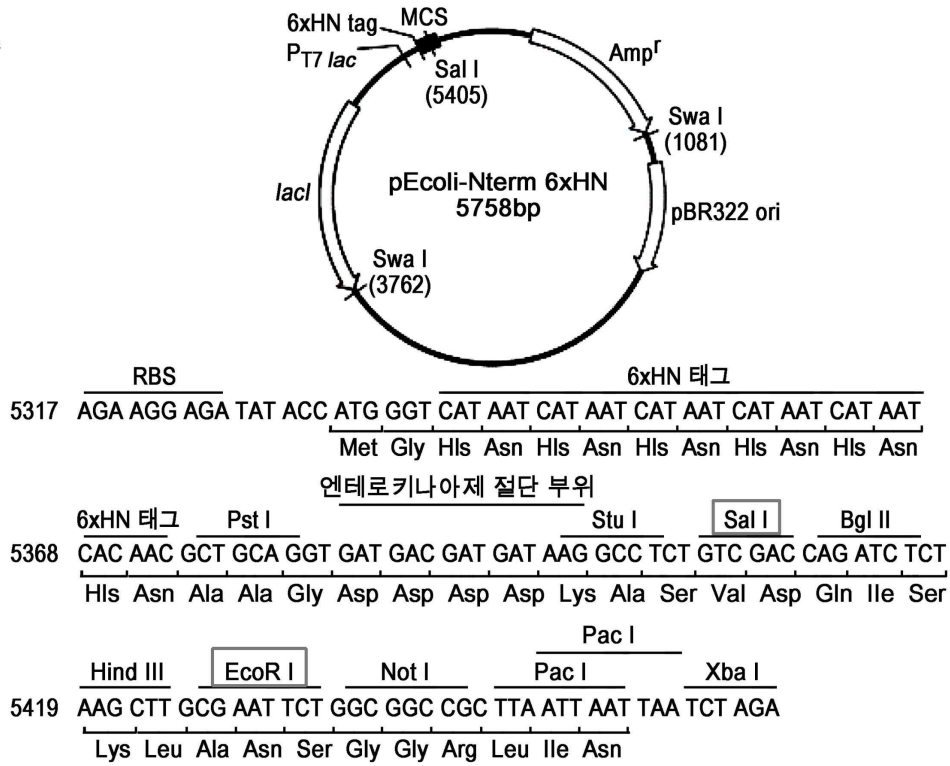


도면17

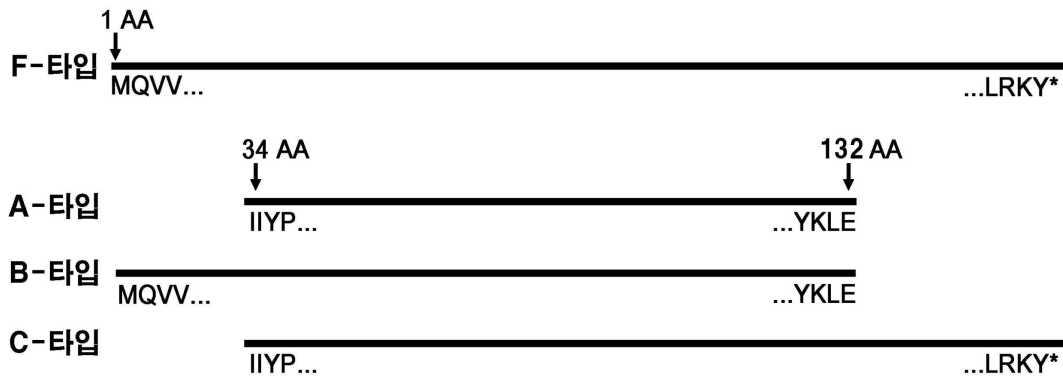


도면20

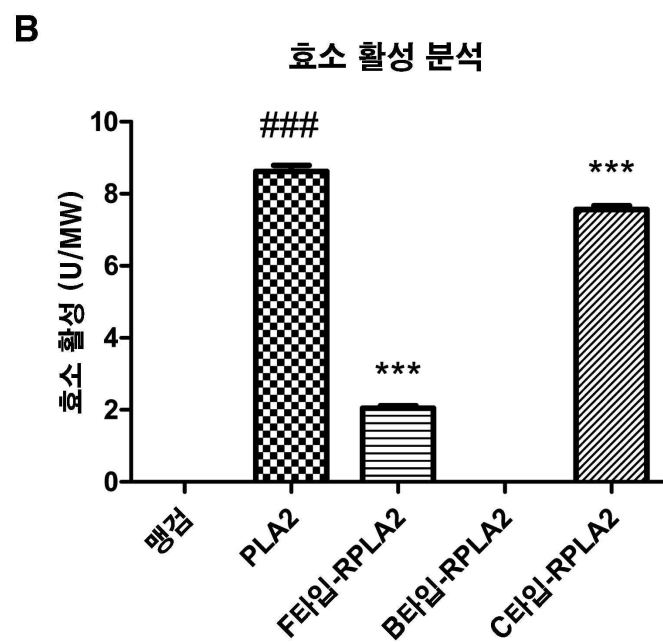
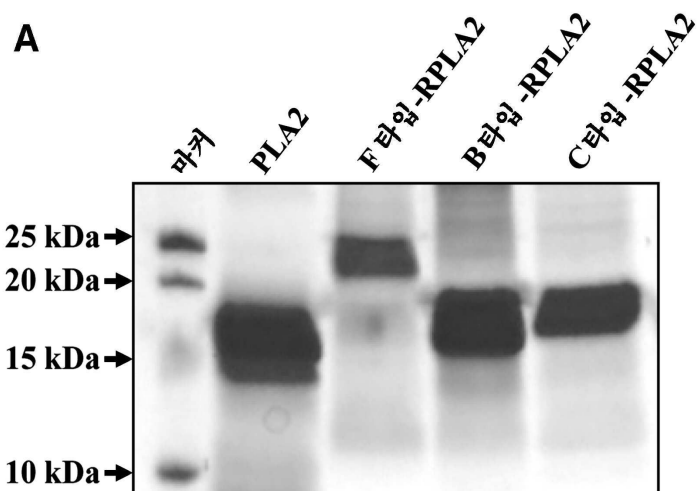
A



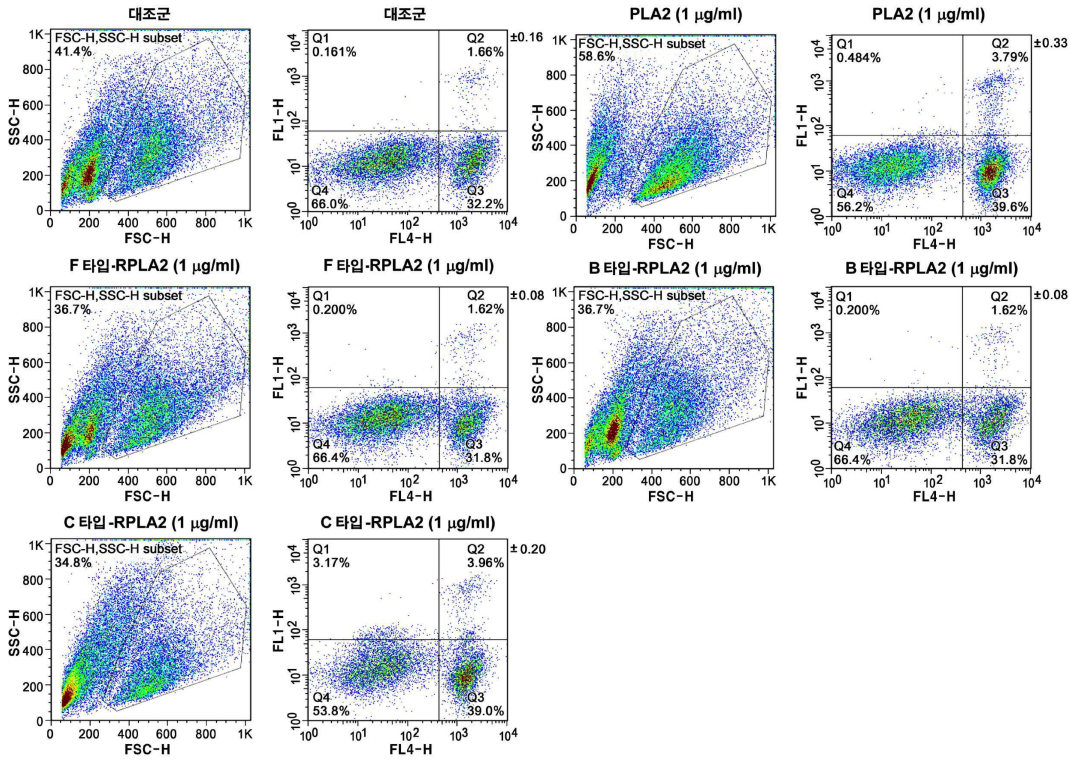
B



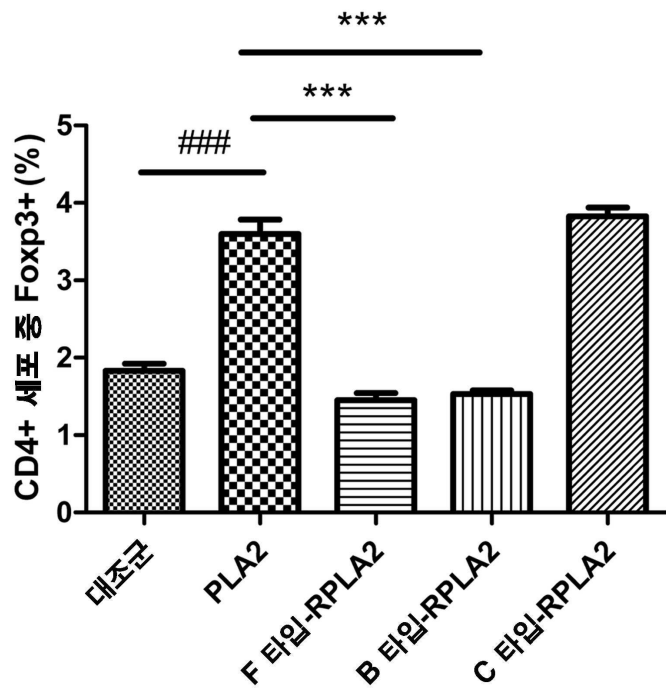
도면21



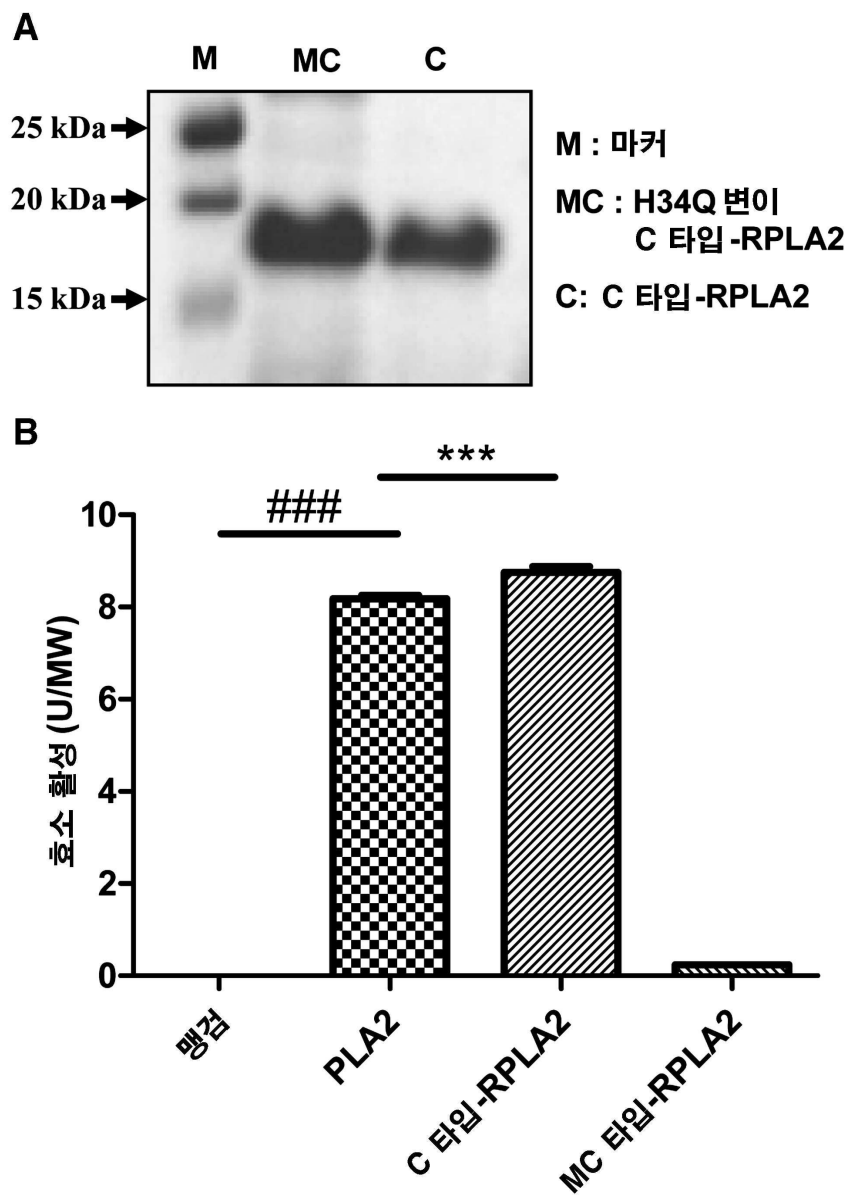
도면22



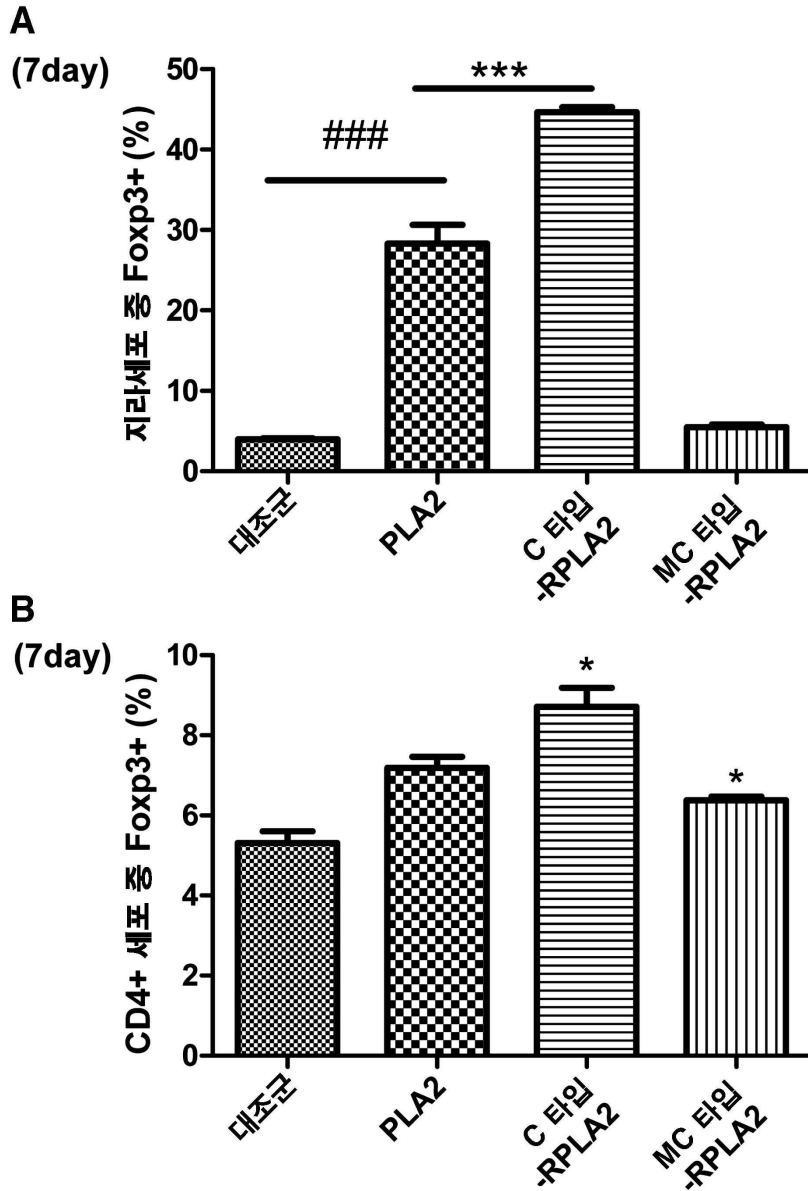
도면23



도면24



도면25



서열목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> Composition for preventing or treating diseases related to
abnormal suppression of regulatory T cell activation comprising
bee venom-derived PLA2
- <130> PA120508/KR
- <150> KR 10-2012-0019925
- <151> 2012-02-27
- <160> 21
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1

<211> 167

<212> PRT

<213> Apis mellifera PLA2 1-167

<400> 1

Met Gln Val Val Leu Gly Ser Leu Phe Leu Leu Leu Leu Ser Thr Ser

1 5 10 15
His Gly Trp Gln Ile Arg Asp Arg Ile Gly Asp Asn Glu Leu Glu Glu
20 25 30
Arg Ile Ile Tyr Pro Gly Thr Leu Trp Cys Gly His Gly Asn Lys Ser
35 40 45
Ser Gly Pro Asn Glu Leu Gly Arg Phe Lys His Thr Asp Ala Cys Cys
50 55 60
Arg Thr His Asp Met Cys Pro Asp Val Met Ser Ala Gly Glu Ser Lys
65 70 75 80

His Gly Leu Thr Asn Thr Ala Ser His Thr Arg Leu Ser Cys Asp Cys
85 90 95
Asp Asp Lys Phe Tyr Asp Cys Leu Lys Asn Ser Ala Asp Thr Ile Ser
100 105 110
Ser Tyr Phe Val Gly Lys Met Tyr Phe Asn Leu Ile Asp Thr Lys Cys
115 120 125
Tyr Lys Leu Glu His Pro Val Thr Gly Cys Gly Glu Arg Thr Glu Gly
130 135 140
Arg Cys Leu His Tyr Thr Val Asp Lys Ser Lys Pro Lys Val Tyr Gln

145 150 155 160
Trp Phe Asp Leu Arg Lys Tyr
165

<210> 2

<211> 134

<212> PRT

<213> Apis mellifera PLA2 34-167

<400> 2

Ile Ile Tyr Pro Gly Thr Leu Trp Cys Gly His Gly Asn Lys Ser Ser

1 5 10 15
 Gly Pro Asn Glu Leu Gly Arg Phe Lys His Thr Asp Ala Cys Cys Arg
 20 25 30
 Thr His Asp Met Cys Pro Asp Val Met Ser Ala Gly Glu Ser Lys His
 35 40 45
 Gly Leu Thr Asn Thr Ala Ser His Thr Arg Leu Ser Cys Asp Cys Asp
 50 55 60
 Asp Lys Phe Tyr Asp Cys Leu Lys Asn Ser Ala Asp Thr Ile Ser Ser
 65 70 75 80
 Tyr Phe Val Gly Lys Met Tyr Phe Asn Leu Ile Asp Thr Lys Cys Tyr
 85 90 95
 Lys Leu Glu His Pro Val Thr Gly Cys Gly Glu Arg Thr Glu Gly Arg
 100 105 110

Cys Leu His Tyr Thr Val Asp Lys Ser Lys Pro Lys Val Tyr Gln Trp
 115 120 125

Phe Asp Leu Arg Lys Tyr

130

<210> 3

<211> 33

<212> PRT

<213> Apis mellifera PLA2 1-33

<400> 3

Met Gln Val Val Leu Gly Ser Leu Phe Leu Leu Leu Leu Ser Thr Ser

1 5 10 15
 His Gly Trp Gln Ile Arg Asp Arg Ile Gly Asp Asn Glu Leu Glu Glu
 20 25 30

Arg

<210> 4

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Additive to N-terminal region

<400> 4

Gly His Asn His Asn His Asn His Asn His Asn His Asn Ala Ala Gly

1 5 10 15

Asp Asp Asp Asp Lys Ala Ser Val Asp

20 25

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Additive to C-terminal region

<400> 5

Ala Asn Ser Gly Gly Arg Leu Ile Asn

1 5

<210> 6

<211> 168

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> C-type recombinant BV-PLA2

<400> 6

Gly His Asn His Asn His Asn His Asn His Asn His Asn Ala Ala Gly

1 5 10 15

Asp Asp Asp Asp Lys Ala Ser Val Asp Ile Ile Tyr Pro Gly Thr Leu

20 25 30

Trp Cys Gly His Gly Asn Lys Ser Ser Gly Pro Asn Glu Leu Gly Arg

35 40 45

Phe Lys His Thr Asp Ala Cys Cys Arg Thr His Asp Met Cys Pro Asp

50 55 60

Val Met Ser Ala Gly Glu Ser Lys His Gly Leu Thr Asn Thr Ala Ser

65 70 75 80

His Thr Arg Leu Ser Cys Asp Cys Asp Asp Lys Phe Tyr Asp Cys Leu

85 90 95

Lys Asn Ser Ala Asp Thr Ile Ser Ser Tyr Phe Val Gly Lys Met Tyr

100 105 110
 Phe Asn Leu Ile Asp Thr Lys Cys Tyr Lys Leu Glu His Pro Val Thr

 115 120 125
 Gly Cys Gly Glu Arg Thr Glu Gly Arg Cys Leu His Tyr Thr Val Asp
 130 135 140
 Lys Ser Lys Pro Lys Val Tyr Gln Trp Phe Asp Leu Arg Lys Tyr Ala
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Gly Arg Leu Ile Asn
 165
 <210> 7
 <211> 201
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> F-type recombinant BV-PLA2
 <400> 7
 Met Gly His Asn His Asn His Asn His Asn His Asn His Asn Ala Ala

 1 5 10 15
 Gly Asp Asp Asp Asp Lys Ala Ser Val Asp Gln Val Val Leu Gly Ser
 20 25 30
 Leu Phe Leu Leu Leu Leu Ser Thr Ser His Gly Trp Gln Ile Arg Asp
 35 40 45
 Arg Ile Gly Asp Asn Glu Leu Glu Glu Arg Ile Ile Tyr Pro Gly Thr
 50 55 60
 Leu Trp Cys Gly His Gly Asn Lys Ser Ser Gly Pro Asn Glu Leu Gly
 65 70 75 80

 Arg Phe Lys His Thr Asp Ala Cys Cys Arg Thr His Asp Met Cys Pro
 85 90 95
 Asp Val Met Ser Ala Gly Glu Ser Lys His Gly Leu Thr Asn Thr Ala
 100 105 110
 Ser His Thr Arg Leu Ser Cys Asp Cys Asp Asp Lys Phe Tyr Asp Cys
 115 120 125
 Leu Lys Asn Ser Ala Asp Thr Ile Ser Ser Tyr Phe Val Gly Lys Met

130 135 140
 Tyr Phe Asn Leu Ile Asp Thr Lys Cys Tyr Lys Leu Glu His Pro Val

 145 150 155 160
 Thr Gly Cys Gly Glu Arg Thr Glu Gly Arg Cys Leu His Tyr Thr Val
 165 170 175
 Asp Lys Ser Lys Pro Lys Val Tyr Gln Trp Phe Asp Leu Arg Lys Tyr
 180 185 190
 Ala Asn Ser Gly Gly Arg Leu Ile Asn
 195 200
 <210> 8
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> B-type recombinant BV-PLA2
 <400
 > 8
 Gly His Asn His Asn His Asn His Asn His Asn His Asn Ala Ala Gly
 1 5 10 15
 Asp Asp Asp Asp Lys Ala Ser Val Asp Met Gln Val Val Leu Gly Ser
 20 25 30
 Leu Phe Leu Leu Leu Leu Ser Thr Ser His Gly Trp Gln Ile Arg Asp
 35 40 45
 Arg Ile Gly Asp Asn Glu Leu Glu Glu Arg Ile Ile Tyr Pro Gly Thr
 50 55 60
 Leu Trp Cys Gly His Gly Asn Lys Ser Ser Gly Pro Asn Glu Leu Gly

 65 70 75 80
 Arg Phe Lys His Thr Asp Ala Cys Cys Arg Thr His Asp Met Cys Pro
 85 90 95
 Asp Val Met Ser Ala Gly Glu Ser Lys His Gly Leu Thr Asn Thr Ala
 100 105 110
 Ser His Thr Arg Leu Ser Cys Asp Cys Asp Asp Lys Phe Tyr Asp Cys
 115 120 125
 Leu Lys Asn Ser Ala Asp Thr Ile Ser Ser Tyr Phe Val Gly Lys Met

130

135

140

Tyr Phe Asn Leu Ile Asp Thr Lys Cys Tyr Lys Leu Glu Ala Asn Ser

145

150

155

160

Gly Gly Arg Leu Ile Asn

165

<210> 9

<211> 99

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> A-type BV-PLA2 fragment

<400> 9

Ile Ile Tyr Pro Gly Thr Leu Trp Cys Gly His Gly Asn Lys Ser Ser

1

5

10

15

Gly Pro Asn Glu Leu Gly Arg Phe Lys His Thr Asp Ala Cys Cys Arg

20

25

30

Thr His Asp Met Cys Pro Asp Val Met Ser Ala Gly Glu Ser Lys His

35

40

45

Gly Leu Thr Asn Thr Ala Ser His Thr Arg Leu Ser Cys Asp Cys Asp

50

55

60

Asp Lys Phe Tyr Asp Cys Leu Lys Asn Ser Ala Asp Thr Ile Ser Ser

65

70

75

80

Tyr Phe Val Gly Lys Met Tyr Phe Asn Leu Ile Asp Thr Lys Cys Tyr

85

90

95

Lys Leu Glu

<210> 10

<211> 133

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> A-type recombinant BV-PLA2

<400> 10

Gly His Asn His Asn His Asn His Asn His Asn His Asn Ala Ala Gly

1 5 10 15
 Asp Asp Asp Asp Lys Ala Ser Val Asp Ile Ile Tyr Pro Gly Thr Leu
 20 25 30
 Trp Cys Gly His Gly Asn Lys Ser Ser Gly Pro Asn Glu Leu Gly Arg
 35 40 45
 Phe Lys His Thr Asp Ala Cys Cys Arg Thr His Asp Met Cys Pro Asp

50 55 60
 Val Met Ser Ala Gly Glu Ser Lys His Gly Leu Thr Asn Thr Ala Ser
 65 70 75 80
 His Thr Arg Leu Ser Cys Asp Cys Asp Asp Lys Phe Tyr Asp Cys Leu
 85 90 95
 Lys Asn Ser Ala Asp Thr Ile Ser Ser Tyr Phe Val Gly Lys Met Tyr
 100 105 110
 Phe Asn Leu Ile Asp Thr Lys Cys Tyr Lys Leu Glu Ala Asn Ser Gly
 115 120 125

Gly Arg Leu Ile Asn

130

<210> 11

<211> 168

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> C-type mutein(H34Q) recombinant BV-PLA2

<400> 11

Gly His Asn His Asn His Asn His Asn His Asn His Asn Ala Ala Gly
 1 5 10 15
 Asp Asp Asp Asp Lys Ala Ser Val Asp Ile Ile Tyr Pro Gly Thr Leu
 20 25 30
 Trp Cys Gly His Gly Asn Lys Ser Ser Gly Pro Asn Glu Leu Gly Arg
 35 40 45

Phe Lys His Thr Asp Ala Cys Cys Arg Thr Gln Asp Met Cys Pro Asp
 50 55 60
 Val Met Ser Ala Gly Glu Ser Lys His Gly Leu Thr Asn Thr Ala Ser

65 70 75 80
 His Thr Arg Leu Ser Cys Asp Cys Asp Asp Lys Phe Tyr Asp Cys Leu
 85 90 95
 Lys Asn Ser Ala Asp Thr Ile Ser Ser Tyr Phe Val Gly Lys Met Tyr
 100 105 110
 Phe Asn Leu Ile Asp Thr Lys Cys Tyr Lys Leu Glu His Pro Val Thr

 115 120 125
 Gly Cys Gly Glu Arg Thr Glu Gly Arg Cys Leu His Tyr Thr Val Asp
 130 135 140
 Lys Ser Lys Pro Lys Val Tyr Gln Trp Phe Asp Leu Arg Lys Tyr Ala
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Gly Arg Leu Ile Asn

 165

<210> 12

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F-type BV-PLA2 primer (Forward)

<400> 12

aatgtcgacc aagtcgttct cggat 25

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F-type BV-PLA2 primer (Reverse)

<400> 13

aaggaattct tatcaatact tgcg 24

<210> 14

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> A-type BV-PLA2 primer (Forward)

<400> 14

aatgtcgaca taatatatcc agga	24
<210> 15	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223>	
> A-type BV-PLA2 primer (Reverse)	
<400> 15	
aaggaattct cacagtttgt aacactt	27
<210> 16	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> B-type BV-PLA2 primer (Forward)	
<400> 16	
aatgtcgacc aagtcgttct cggat	25
<210> 17	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> B-type BV-PLA2 primer (Reverse)	
<400> 17	
aaggaattct cacagtttgt aacactt	27
<210> 18	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> C-type BV-PLA2 primer (Forward)	
<400> 18	
aatgtcgaca taatatatcc agga	24
<210> 19	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> C-type BV-PLA2 primer (Reverse)

<400> 19

aaggaattct tatcaatact tgcg

24

<210> 20

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> C-type mutein (H34Q) BV-PLA2 primer (Forward)

<400> 20

gcatgctgtc gaaccaaga catgtgcccg gacg

34

<210> 21

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C-type mutein (H34Q) BV-PLA2 primer (Reverse)

<400> 21

cgtccgggca catgtcttgg gttcgacagc atgc

34