



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0039061
(43) 공개일자 2013년04월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0784 (2010.01) C12N 1/38 (2006.01)
C07K 14/195 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0103498
(22) 출원일자 2011년10월11일
심사청구일자 2011년10월11일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
신성재
대전광역시 중구 문화로 266, 충남대학교 의학전
문대학원 미생물학교실 (문화동)
최한규
대전광역시 중구 문화로 266, 충남대학교 의학전
문대학원 미생물학교실 (문화동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

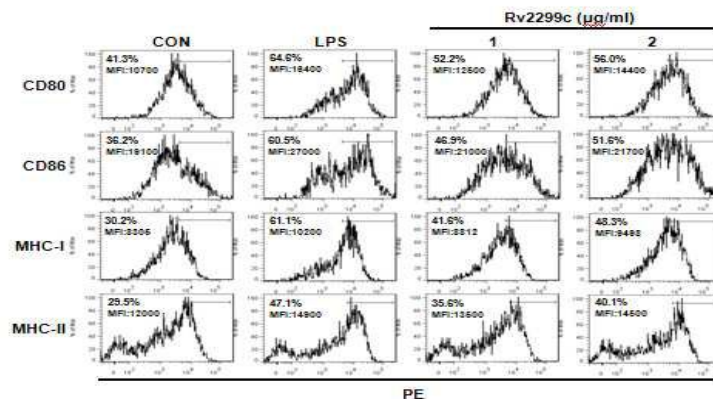
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 결핵균의 Rv2299c 단백질을 이용한 수지상 세포의 성숙방법

(57) 요약

본 발명은 수지상 세포를 성숙시키는 방법에 관한 것이다. 더욱 구체적으로는 결핵균 (*Mycobacterium tuberculosis*) 유래의 Rv2299c 단백질을 유래의 Rv2299c 단백질을 이용하여 미성숙 수지상 세포를 성숙 수지상 세포로 분화시키는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도2a



(72) 발명자

변의홍

대전광역시 중구 문화로 266, 충남대학교 의학전문
대학원 미생물학교실 (문화동)

김우식

대전광역시 중구 문화로 266, 충남대학교 의학전문
대학원 미생물학교실 (문화동)

김중석

대전광역시 중구 문화로 266, 충남대학교 의학전문
대학원 미생물학교실 (문화동)

김화중

대전광역시 중구 문화로 266, 충남대학교 의학전문
대학원 미생물학교실 (문화동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1120390

부처명 보건복지부

연구사업명 암정복추진연구개발사업

연구과제명 수지상세포 기반 항암면역요법 효율 개선을 위한 면역증강제 개발

주관기관 충남대학교 산학협력단

연구기간 2011.05.01 ~ 2012.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

Rv2299c 단백질을 유효성분으로 포함하는 수지상 세포 성숙화 유도 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 Rv2299c 단백질은 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*) 유래의 단백질인 것을 특징으로 하는 수지상 세포 성숙화 유도 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 Rv2299c 단백질이 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 포함된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

미성숙 수지상 세포에 Rv2299c를 처리하는 것을 특징으로 하는 미성숙 수지상 세포의 성숙화 유도 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 처리 후 세포를 12시간 이상 36시간 이하로 배양하는 것을 특징으로 하는 성숙화 유도 방법.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 미성숙 수지상 세포의 성숙화는 TNF- α , IL-12p70, IL-6, IL-1 β 생성의 증가인 것을 특징으로 하는 성숙화 유도 방법.

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 Rv2299c 단백질은 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 처리되는 것을 특징으로 하는 성숙화 유도 방법.

청구항 8

제1항 또는 제2항의 조성물을 포함하는 면역 증강용 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 면역은 Th1형 면역반응임을 특징으로 하는 면역 증강용 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 수지상 세포 성숙화 유도 조성물 및 수지상 세포를 성숙시키는 방법에 관한 것이다. 더욱 구체적으로는 결핵균 (*Mycobacterium tuberculosis*) 유래의 Rv2299c 단백질을 유효 성분으로 포함하는 수지상 세포 성숙화 유도 조성물 및 이를 이용하여 미성숙 수지상 세포를 성숙 수지상 세포로 분화시키는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 수지상 세포 또는 수상돌기 세포 (dendritic cell, DC)는 포유동물의 면역 계의 일부를 이루는 면역 세포이다. 이 세포들은 항원 물질을 처리하여 그것을 표면에 나타내게 함으로써 면역계의 다른 세포가 인식하게 하는 항원 발현 세포의 역할을 한다. 수지상 세포는 주로 피부, 코, 폐, 위 및 장의 내벽과 같이 외부 환경과 접하는 조직에 소량 존재하며 특히 피부에 있는 세포를 랑게르한스 세포라 한다. 수지상 세포는 혈액 중에서 미성숙한 상태로 발견될 수 있으며, 활성화되면 림프기관으로 이동하여 T 세포 및 B 세포와 상호작용하여 면역반응이 시작되게 한다. 특정 발달 단계에서 그것들은 수상돌기 (dendrites)라고 하는 돌기를 뻗는다.

[0003] 수지상 세포는 조혈 골수 전구세포 (hemopoietic bone marrow progenitor cells)로부터 유래한다. 이 전구세포는 처음에는 미성숙 수지상 세포로 변화하며, 높은 엔도시토시스 활성 및 T-세포 활성 능력을 특징으로 한다. 미성숙 수지상 세포는 주변에 있는 바이러스 및 박테리아와 같은 병원체를 끊임없이 탐식한다. 이것은 TLR (toll-like receptor)와 같은 패턴 인식 수용체 (pattern recognition receptor, PRR)를 통해서 가능하다. TLR은 병원체의 서브셋 상에서 발견되는 특정 화학적 특징을 인식하며, 미성숙 수지상 세포는 살아있는 자가세포로부터 니블링 (nibbling)이라는 과정을 통해 세포막을 탐식한다. 이들이 현존하는 항원과 접하게 되면, 성숙 수지상 세포로 활성화되어 림프절로 이동한다. 미성숙 수지상 세포는 병원체를 탐식하고 자신의 단백질을 작은 조각들로 분해해서, 성숙하였을 때 이 조각들이 MHC (Major Histocompatibility Complex) 분자를 이용하여 그 세포 표면에 나타내게 된다. 동시에, 그것은 CD (Cluster of Differentiation)80, CD86, 및 CD40과 같이 T-세포 활성화에서의 공동-수용체로 작용하는 세포 표면 수용체를 증가시킨다. 그것들은 비 항원성 특정 공동자극 신호와 함께 병원체에서 유래한 항원을 나타냄으로써 헬퍼 T-세포, 킬러 T-세포 뿐만 아니라, B 세포를 활성화시킨다.

[0004] 모든 헬퍼 T-세포는 하나의 특정 항원에 대해 특이적이다. 오직 전문적인 항원 발현 세포(대식세포, B림프구 및 수지상 세포)만이 맞는 항원이 존재할 때 나머지 헬퍼 T-세포를 활성화시킨다. 그러나 대식세포와 B림프구는 메모리 T-세포만 활성화시킬 수 있는 반면에 수지상 세포는 메모리 및 처녀 (naive) T-세포를 모두 활성화시킬 수 있어서 가장 강력한 항원 발현 세포이다.

[0005] 성숙 수지상 세포는 신체를 순환하는 백혈구인 단핵구로부터 유래할 수 있는데, 단핵구는 적절한 신호에 따라 수지상 세포로도 대식세포로도 바뀔 수 있다. 단핵구는 골수의 줄기세포에서 유래한다. 단핵구-유래 수지상 세포는 실험실에서 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)로부터 생성될 수 있다. PBMC를 조직 배양 플라스크에 심어서 단핵구가 부착되게 할 수 있는데 이 단핵구를 IL-4 및 GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor)로 처리함으로써 미성숙 수지상 세포로 분화시킬 수 있다. 이후에 TNF α 로 처리하면 미성숙 수지상 세포가 성숙 수지상 세포로 분화된다.

[0006] 완전히 성숙한 수지상 세포는 미숙한 DC와는 정성적 및 정량적으로 상이하다. 완전히 성숙한 DC는 고 수준의 MHC (Major Histocompatibility Complex)I형 및 II형 항원, 및 고수준의 T 세포 공동자극성 분자, 즉 CD80 및 CD86을 발현시킨다. 이들 변화는 수지상 세포의 T 세포 활성화 능력을 증가시키는데, 이는 이들이 세포 표면상의 항원 밀도를 증가시킬 뿐만 아니라, 예를 들어 CD28과 같은 T 세포 상의 공동자극성 분자의 대응물을 통한 T 세포 활성화의 양을 증가시키기 때문이다. 추가로, 성숙한 DC는 다량의 사이토카인을 생성하며, 이 사이토카인은 T 세포 반응을 자극하고 유도한다. 이들 사이토카인 중 2 가지는 인터루킨 10 (IL-10) 및 인터루킨 12 (IL-12)이다. 이들 사이토카인은 유도된 T 세포 반응의 방향에 대해 정반대의 효과를 갖는다. IL-10이 생성되면 Th-2형 반응이 유도되는 반면, IL-12가 생성되면 Th-1 형 반응이 유도된다. 후자의 반응이 세포 면역 반응이 요구되는 경우, 예를 들면 암 면역요법에서 특히 바람직하다. Th-1형 반응에 의해 세포 면역계의 작동인자 공격수단인 세포독성 T 림프구(CTL)가 유도 및 분극화된다. 이러한 작동인자 공격수단은 종양 성장을 억제하는 데 가장 효과적이다. IL-12는 또한 천연 킬러 (NK) 세포의 성장을 유도하고, 항-혈관신생 활성을 갖고, 이는 모두 효과적인 항-종양 공격수단이다. 따라서, IL-12를 생성하는 수지상 세포의 사용은 면역자극에 사용하는데 이론상 최

적으로 적합하다.

- [0007] 수지상 세포는 혼치 않고 분리하기 어렵기 때문에 서로 다른 유형과 서브셋의 수지상 세포의 정확한 생성과 발달 및 그 상호관계에 대해서는 오직 대략적으로만 알려졌다. 수지상 세포는 신체의 다른 세포들과 끊임없는 소통을 한다. 이러한 소통은 세포 표면 단백질의 상호작용에 근거한 직접적인 세포 대 세포 접촉의 형태를 취할 수 있다.
- [0008] 수지상 세포에 의해 생산되는 사이토카인은 세포의 유형에 따라 다르다. 림프구성 수지상 세포는 다량의 타입-1 IFN을 생산할 수 있는데 그것은 더 많은 활성화된 대식 세포를 모아서 탐식 작용을 가능하게 한다. 림프구성 수지상 세포는 중추와 말초 면역조절에 관여하고, 골수성 수지상 세포는 외래성 항원이나 감염에 대한 면역유도에 관여하는 것으로 알려져 있다. 따라서 수지상 세포가 정상 기능을 못할 경우 당뇨병, 류머티스성 관절염, 알레르기성 과민반응과 같은 자가 면역 질환이 나타나거나 감염성 질환이나 암 발생에 대해 정상적인 면역반응이 일어나지 않게 된다.
- [0009] 암환자에서는 수지상 세포의 기능이 저하되어 있어 정상적 항암 면역능을 유도하는 것이 어렵다. 지금까지 수지상 세포의 분화를 조절(활성화)하는 물질들(LPS, TNF- α , IL-1 β)은 많이 알려져 있으나 생체독성의 부작용으로 생체への 직접적인 응용에 문제가 많다.
- [0010] 마이코박테리움 (Mycobacterium) 속(屬)에는 결핵, 우형결핵 (牛形結核), 나병 (癩病)과 같이 사람과 동물에 심각한 질병을 일으키는 균종 (species)뿐 아니라, 기회감염균으로 일컬어지는 균종, 그리고 자연환경에서 볼 수 있는 사물 (死物)기생의 균종 (saprophytic species) 등 현재까지 약 72 종(species)이 알려져 있으며, 그 중 인체 질환과 관련된 것이 25종에 이르는 것으로 알려져 있다.
- [0011] 마이코박테리아 감염증 가운데 가장 많은 질병은 결핵 (Tuberculosis)으로, 강한 병원성을 갖는 결핵균군 (群)(*M.tuberculosis* complex: TB complex)으로 구분되는 *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M.africanum*, *M. microti*의 4 종이 원인균이며, 이 중 결핵균 (*M. tuberculosis*)이 가장 흔하고 중요한 원인균으로 알려져 있다. 결핵은 국내에서 아직까지도 중요시되는 질환이며, 전세계적으로는 해마다 약 8 백만의 새로운 환자가 발생하는 것으로 보고되고 있다.
- [0012] 상기와 같이 수지상 세포는 신체 자체의 면역 기능을 높이는데 중요한 역할을 하고 있어, 수지상 세포의 분화를 촉진하여 성숙시킴으로써 강력한 면역 반응을 일으키는 무독성의 면역조절제의 개발과 그 물질의 작용기전을 명확히 이해하는 것은 수지상 세포를 이용한 세포 면역 치료에 중요한 과제가 되고 있다
- [0013] 본 발명자들은 상기와 같은 요구를 충족시키기 위하여 연구를 거듭한 결과 결핵균에서 유래한 Rv2299c이 수지상 세포를 효과적으로 성숙시킨다는 사실을 발견함으로써 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0014] 본 발명은 미성숙된 수지상 세포를 간편하고 효과적으로 성숙시킬 수 있는, Rv2299c 단백질을 유효성분으로 포함하는 미성숙 수지상 세포 성숙화 유도 조성물 및 미성숙 수지상 세포에 Rv2299c를 처리하여 성숙 수지상 세포로 성숙화 시키는 것을 특징으로 하는 미성숙 수지상 세포의 성숙화 유도방법을 제공한다. 또한 본 발명은 상기 수지상 세포 성숙화 유도 조성물을 포함하는 면역 증강용 조성물을 제공한다.

과제의 해결 수단

- [0015] 상기와 같은 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 Rv2299c 단백질을 유효성분으로 포함하는 수지상 세포 성숙화 유도 조성물을 제공한다.
- [0016] 또한 본 발명은, 미성숙 수지상 세포에 Rv2299c를 처리하는 것을 특징으로 하는 미성숙 수지상 세포의 성숙화 유도 방법을 제공한다.

[0017] 또한 본 발명은, 상기 수지상 세포 성숙화 유도 조성물을 포함하는 면역 증강용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0018] 본 발명에 따르면, 미성숙 수지상 세포의 분화를 촉진함으로써 수지상 세포를 효과적으로 성숙시킬 수 있으며 이를 통해 신체의 면역 반응을 효과적으로 증강시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도1a는 클로닝을 통해 분리한 재조합 단백질 Rv2299c를 나타낸 것이다. (a: His-tagged 재조합Rv2299c 와 벡터 대조군 (CON)에 대한 SDS-PAGE 비교, b: NTA로 정제한 후 SDS-PAGE, c: 웨스턴 블롯 분석).

도 1b는Rv2299c를 처리한 수지상 세포의 생존률 측정 실험 결과를 나타낸 그래프이다.

도2a는 Rv2299c를 처리한 수지상 세포에서 특이적인 단백질표면인자인 CD80, CD86과 MHC class I, II의 발현을 분석한 그래프이다

도2b는 Rv2299c를 처리한 수지상 세포에서 특이적인 단백질표면인자인 CD80, CD86과 MHC class I, II의 발현 양을 수치로 나타낸 그래프이다.

도3 a, b는 Rv2299c를 처리한 수지상 세포의 사이토카인(TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-12 p70, IL-10) 분비 실험 결과를 나타낸 그래프이다.

도 4a는 Rv2299c에 의해 유도되는 수지상 세포의 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 방출에 대한 열변성의 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 4b는 Rv2299c에 의해 유도되는 수지상 세포의 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 방출에 대한 프로테아제 K 소화의 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 4c는 Rv2299c에 의해 유도되는 수지상 세포의 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 방출에 대한 PMB의 영향 분석 결과를 나타낸 것이다

도 5는 Rv2299c를 처리한 수지상 세포의 텍스트란-FITC 탐식능력 측정 결과를 나타낸 그래프이다.

도 6 a,b는 Rv2299c를 처리한 수지상 세포에서 신호 전달계의 변화를 억제인자들을 통하여 사이토카인(TNF- α , IL-6, IL-1 β) 분비와 단백질표면인자인 CD80, CD86을 통하여 확인한 그래프이다.

도 7a는 Rv2299c를 처리한 수지상 세포의 성숙 관여 TLR 실험 결과를 나타낸 것이다.

도 7b는 MyD88, TRIF와 Rv2299c를 처리한 수지상 세포의 성숙과의 관계를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 본 발명은 Rv2299c를 유효성분으로 포함하는 수지상 세포 성숙화 유도 조성물에 관한 것이다.

[0021] 본 발명은 Rv2299c를 유효성분으로 포함하는 수지상 세포 성숙화 유도 조성물에 관한 것이다.

[0022] Rv2299c (HtpG protein, HSP-90)는 647개의 아미노산 서열로 이루어진 72.8KDa 세포질 항원이다. HSP90는 세포 안에서 가장 많이 발현되는 단백질 중 하나이며, 스트레스에 의해 분비되는 열 충격 단백질(heat shock protein)중의 하나이다. HSP90은 박테리아와 모든 진핵생물에서 발견되며, 세포 생육에 많은 관련이 있다. Mycobacterium tuberculosis H37Rv 표준균주 (NCBI GenBank ID:CAB00972.1) 전체 유전자 지도 해석을 통하여 부여된 Rv2299c의 단백질의 고유ID 번호는 1449321이다.

[0023] 본 발명은 결핵균 (*M. tuberculosis*)에 대한 유전자를 클로닝하여 대장균 발현시스템을 이용하여 분리, 정제하여 수지상 세포 성숙화 유도 조성물을 제공할 수 있다.

[0024] 미숙한 수지상 세포는 성숙하여 성숙한 수지상 세포를 형성한다. 성숙한 수지상 세포는 항원을 포획하고 동시 자극하는 세포 표면 분자 및 각종 사이토카인의 상향-조절된 발현을 나타내는 능력을 상실한다. 특히, 성숙한 수지상 세포는 MHC I형 및 II형 항원을 미숙한 수지상 세포보다 더 높은 수준으로 발현시키고, CD (Cluster of

Differentiation) 80+, CD83+, CD86+ 및 CD14-을 조절한다. 더 많은 MHC 발현으로 수지상 세포 표면상에서 항원 밀도의 증가를 유도하는 반면, 동시-자극의 분자 CD80 및 CD86의 상향 조절로, T 세포 상에 CD28과 같은 동시-자극의 분자 상응물을 통해서 T 세포 활성화 시그널을 강화한다.

[0025] 본 발명은 Rv2299c를 포함하는 조성물을 통해 성숙한 수지상 세포로의 분화를 촉진할 수 있다. 유효한 재조합 방법으로 제조된 Rv2299c는 이에 제한되는 것은 아니나 1 μ g/ml 내지 5 μ g/ml, 바람직하게는 1 μ g/ml 내지 2 μ g/ml 농도로 조성물에 포함될 수 있다.

[0026] 또한 본 발명은 미성숙 수지상 세포에 Rv2299c를 처리하는 것을 특징으로 하는 미성숙 수지상 세포의 성숙화 유도방법을 제공할 수 있다.

[0027] 본 발명의 Rv2299c 단백질은 1 μ g/ml 내지 5 μ g/ml, 바람직하게는 1 μ g/ml 내지 2 μ g/ml 농도로 처리될 수 있다. 본 발명은 미성숙 수지상 세포에 Rv2299c를 처리하여 성숙화를 유도하기 위하여 Rv2299c가 처리된 세포를 배양할 수 있다. 적절한 성숙 수지상 세포로의 분화 유도를 위하여 상기 세포를 바람직한 일 예로써 12시간 이상 36시간 이하로 배양하여 성숙시킬 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0028] 본 발명에서의 Rv2299c 단백질 처리를 통해 성숙이 촉진된 성숙된 수지상 세포는 성숙된 수지상 세포가 가지는 일반적인 특징을 발현할 수 있다. 본 발명에 따르면, Rv2299c를 유효성분으로 처리함으로써 미성숙 수지상 세포가 분화되어 성숙한 수지상 세포로 변화하며, 보다 바람직하게는 IL-6, IL-1 β 및 TNF- α 의 생성이 증가된 성숙 수지상 세포로 변화할 수 있다. 본 발명의 조성물을 통해 형성되는 성숙 수지상 세포는 바람직하게는 IL-10의 분비에는 영향을 주지 않는 세포로 분화될 수 있으며 이에 따라 Th1 형의 세포로 편향될 수 있다.

[0029] 또한, 본 발명은 Rv2299c를 유효성분으로 포함하는 수지상 세포 성숙화 유도 조성물을 포함하는 면역 증강용 조성물을 제공할 수 있다. 본 발명에 따르면 미성숙의 수지상 세포가 성숙되며, 수지상 세포의 성숙으로 표면 단백질 표시인자의 발현이 증가 될 수 있다. 보다 구체적으로 본 발명의 면역 증강용 조성물에 따르면, 유효성분인 Rv2299c의 처리를 통해서 수지상 세포를 성숙시키고 결과적으로 T 세포의 활성을 유도하여 면역 반응을 증가시킬 수 있다.

[0030] 수지상 세포의 성숙은 당해 기술분야에 공지된 방법으로 모니터할 수 있으며 세포 표면 마커를 유세포 분석기(flow cytometry) 및 면역조직화학법 등과 같은 당해 기술분야에 친숙한 검정으로 검출할 수 있다. 또한 상기 세포를 사이토카인 생성 (예, ELISA, FACS 및 다른 면역 검정)을 통해 모니터할 수 있다.

[0031] 이하, 본 발명을 실시 예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예들은 본 발명을 더욱 쉽게 이해할 수 있도록 예시하는 것으로 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0032] 실시 예 1. 수지상 세포 분리 및 재조합 Rv2299c의 클로닝

[0033] 1. 1 수지상 세포의 분리 및 유도

[0034] C57BL/6마우스로부터 골수 채취용 주사를 이용해 대퇴부 골수를 채취하였다. 채취한 골수를 세척한 후 적혈구를 염화암모늄을 이용하여 제거하였다. 분리한 세포를 6-웰 플레이트에서 RPMI 1640 (10% FBS(Fetal bovine serum, 송아지 혈청), 2 mM L-글루타민, 100 U/ml 페니실린/스트렙토마이신, 50 μ M 머캅토에탄올, 0.1 mM 비필수 아미노산, 1 mM 피루브산 나트륨, 20 ng/ml GM-CSF, 20 ng/ml IL-4)을 첨가하여 8 일 동안 배양하였다. GM-CSF 및 IL-4은 수지상 세포로의 분화를 유도하기 위하여 사용하였다.

[0035] 1.2 재조합 Rv2299c의 클로닝

[0036] 결핵균 게놈 DNA로부터 Rv2299c를 분리하여 클로닝하였다. 정방향 프라이머의 (5'-CGC CATATGAACGCCCATGTCGAGC-3') 및 역방향 프라이머 (5'-CCCAAGCTT CAAGGTACGCGAGACGTTTC-3')를 이용해 Rv2299c 부위를 증폭시켰다. PCR 산물을 NdeI 과 HindIII 효소들로 절단하고, 발현벡터인 pET-22b(+)(Novagen, Madison, WI)에 삽입하였다. Rv2299c 유전자가 삽입된 pET-22b(+)(Novagen, Madison, WI) 벡터로 형질 전환시킨 E. coli BL21을 37°C 에서 600 nm에서의 흡광도 (OD)가 0.4 내지 0.5가 되도록 배양한 후에 1 mM의 이소프로필-D-티오갈락토피라노사이드 (IPTG)를 첨가하고 6시간 동안 배양하였다. 발현된 단백질은 니켈-니트릴로트라이아세트산 (Ni-NTA, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 아가로스를 이용하여 제조사의 방법에 준하여 정제하였다. 최종적으로 정제한 재조합 단백질은 SDS-PAGE로 분석하였으며, 72.8 kDa 위치에서 확인하였다 (도면 1a-(b), (c)).

[0037] **실시예 2. Rv2299c의 세포 독성 확인**

[0038] Rv2299c 로 자극한 수지상 세포의 세포 생존율을 측정하기 위해서, 수지상 세포를 2 µg/ml 농도의 Rv2299c 또는 대조군으로 100ng/ml 농도의 LPS (lipopolysaccharide)를 24 시간 동안 처리하였다. 이 후 요오드화 프로피듐(propidium iodide, PI) 및 아넥신-V로 이중 염색하고 유세포분석기(flow cytometry)를 통해 분석하였다. 도면 1b에 나타낸 바와 같이 2 µg/ml 농도의 Rv2299c 는 수지상 세포에서 독성을 나타내지 않았다.

[0039] **실시예 3. Rv2299c에 의한 수지상 세포의 표면 인자 발현 분석**

[0040] 먼저 모든 세포의 성숙도를 균일하게 하기 위하여 GM-CSF 와 IL-4가 함유된 OptiMEM 배지에서 유지한 후, 수지상 세포에 1 µg/ml 및 2 µg/ml 농도의 Rv2299c 및 100 ng/ml 농도의 LPS를 각각 24시간 처리한 후 수지상 세포를 회수하였다. 비 특이적인 결합을 억제하기 위하여 1 µg/ml의 Fc γ I/III(BD bioscience)을 4℃에서 20분간 처리한 후, 수지상 세포 분석을 위해CD11c-FITC(BD bioscience)로 4℃에서 20분간 염색하였다. 이 후 항-CD80-PE(BD bioscience), 항-CD86-PE(BD bioscience), 항-MHC I 및 II-PE(BD bioscience)와 같은 세포 표면 인자 항체를 이용하여 염색한 후 유세포 분석기 FACs Canto (BD Biosciences)로 분석하였다(도 2). 도 2에 나타낸 바와 같이 Rv2299c은 수지상 세포의 단백질 표면 인자인 CD80, CD86와 MHC class I, II의 발현을 용량 의존적으로 증가시켰다. 이를 통해Rv2299c에 의해 수지상 세포의 성숙이 이루어졌음을 확인할 수 있었다.

[0041] **실시예 4. Rv2299c 가 수지상 세포의 사이토카인 분비에 미치는 영향 분석**

[0042] 수지상 세포의 성숙 여부에 따라 분비되는 사이토카인의 종류가 달라진다. 이를 확인하기 위해 수지상 세포에 1 µg/ml 또는 2 µg/ml 농도의 Rv2299c 또는 대조군으로 100ng/ml의 LPS 를 처리한 후 24 시간 동안 배양하였다. 상층액을 TNF-α, IL-6, IL-1β, IL-10 및 IL-12 p70 에 대한 ELISA 키트에 적용하여 사이토카인 분비량을 측정하였다(도 3a). IL-12 p70와 IL-10은 수지상 세포에서 분비되는 주요 사이토카인으로 각각 T 세포가 Th1과 Th2로 분화되는데 중요한 역할을 한다. IL-12는 대표적인 Th1형 사이토카인이며, IL-10은 활성화 된 단핵구, NK 세포 및 Th1 세포에 의해 생산되는 사이토카인 (IL-12 p70포함)의 활성을 방해하는 것으로 알려져 있다. 이러한 내용들을 바탕으로 세포내의 IL-12 p70와 IL-10의 분비량을 측정하기 위해 항-IL-12 p70-APC (BD bioscience)과 항-IL-10-APC를 염색하여 유세포 분석기 FACScallibur (Beckson Dickinson, USA)로 분석하였다(도면3b). 도면 3a 에 나타낸 바와 같이 IL-12 p70가 증가했고 전염증 사이토카인인 TNF-α, IL-6, IL-1β 또한 증가하였으므로, Rv2299c이 수지상 세포를 성숙하게 하여 사이토카인의 양에 변화를 준다는 것을 알 수 있다. 반면 IL-10의 분비에는 유의성 있는 증가를 보이지 않아, Rv2299c이 수지상 세포를 Th1형 세포로 편향할 수 있는 가능성을 확인할 수 있었다.

[0043] **실시예5. LPS 및 Rv2299c에 의해 유도되는 수지상 세포의 TNF-α 및 IL-6 방출에 대한 열변성, 프로테아제 K 소화 및 PMB에 대한 영향 분석**

[0044] **5.1 열변성의 효과 측정**

[0045] LPS 및 Rv2299c에 의해 유도되는 수지상 세포의 TNF-α 및 IL-6 방출에 대한 LPS 및 Rv2299c의 열변성의 영향을 분석하기 위해, C57BL/6 마우스의 미성숙 수지상 세포를 100 ng/ml LPS 또는 2 µg/ml Rv2299c, 또는 끓인 LPS 또는 Rv2299c로 처리하거나, 처리하지 않았다. 24시간 후에 상기 수지상 세포의 상층액내 TNF-α, IL-6, IL-1β 의 양을 ELISA를 이용하여 분석하였다. 도면 4A에 나타낸 바와 같이 Rv2299c은 단백질이므로 끓이면 분해되기 때문에 끓인 Rv2299c의 경우 TNF-α, IL-6, IL-1β의 분비가 억제되었다. 반면, LPS의 경우에는 끓이더라도 TNF-α, IL-6, IL-1β의 분비에 차이가 없었다 (도면 4a).

[0046] **5.2 프로테아제 K 처리시 효과 측정**

[0047] 또한, 100 ng/ml LPS 또는 2 µg/ml Rv2299c에 프로테아제 K로 처리한 후 미성숙 수지상 세포의 배양물에 첨가하였다. 프로테아제 K의 농도를 LPS와 Rv2299c농도의 1/20로 처리한 후 50℃에서 1시간 활성화시키고 100℃에

서 비활성시켰다. 상기 수지상 세포의 상층액내 TNF- α , IL-6, IL-1 β 양을 ELISA를 이용하여 분석하였다. 도면 4b에 나타난 바와 같이 Rv2299c는 단백질이므로 단백질 분해효소인 프로테아제 K로 처리하면 분해되기 때문에 프로테아제 K를 처리한 Rv2299c의 경우 TNF- α , IL-6, IL-1 β 의 분비가 억제되었다. 반면 LPS의 경우에는 프로테아제 K를 처리하여도 TNF- α , IL-6, IL-1 β 의 분비에 차이가 없었다 (도면 4b).

5.3 polymyxin B (PMB) 처리 후의 효과 측정

Rv2299c의 수지상 세포 활성화의 효과가 LPS의 오염에 의한 것이 아닌지 확인하기 위해, C57BL/6 마우스의 미성숙 수지상 세포를 LPS 억제제인 polymyxin B (PMB)로 전처리한 후 또는 전처리 없이 100ng/ml LPS 또는 10 μ g/ml Rv2299c로 24시간 동안 처리하였다. 24시간 후에 상기 수지상 세포의 상층액내 TNF- α , IL-6, IL-1 β 의 양을 ELISA를 이용하여 분석하였다.

도면 4c에 나타난 바와 같이 LPS의 경우 LPS에 의한 TNF- α , IL-6, IL-1 β 의 분비가 PMB에 의해 감소되는 반면, Rv2299c의 경우 PMB를 처리하더라도 TNF- α , IL-6, IL-1 β 의 분비에는 영향이 없었다. 이는 Rv2299c가 LPS 오염에 의한 것이 아님을 증명한다 (도면 4c).

실시예 6. Rv2299c에 의한 수지상세포의 항원 취득 능력 분석

미성숙 수지상세포는 항원취득을 잘하지만, 성숙한 수지상세포는 항원취득 능력이 감소한다고 알려져 있다. 따라서 Rv2299c 단백질이 수지상세포의 대식 활동 (endocytic activity)에 미치는 영향을 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 미성숙 수지상 세포를 1 및 2 μ g/ml의 Rv2299c 또는 100 ng/ml LPS를 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 이 수지상 세포에 1 μ g/ml의 플루오레신 결합 텍스트란(fluoresceinconjugated dextran, 분자량 40,000; Molecular Probes, Eugene, OR)을 1시간 동안 첨가하였다. 37 $^{\circ}$ C와 4 $^{\circ}$ C에서 각각 30분 동안 배양한 후 쿨드 스테이닝 완충액을 첨가하여 반응을 정지시킨 후 세포를 세척하였다. 이 후 PE (Phycoerythrin)-결합 CD11c (BD bioscience)로 염색한 후에 유세포분석기FACs Canto (BD Biosciences)를 이용하여 텍스트란-FITC(Fluorescein isothiocyanate) 탐식능을 측정하였다(도 5). 도5에 나타난 바와 같이, Rv2299c를 처리한 수지상 세포가 그렇지 않은 것보다 텍스트란(항원) 포식 능력이 감소하였다. 이러한 점에서 Rv2299c이 기능적인 면에서 수지상 세포를 성숙시킴을 알 수 있다. 텍스트란의 수지상 세포에 대한 비특이적 결합을 측정하기 위해서 4 $^{\circ}$ C에서도 측정하여 결과값을 보정하였다. 이를 통해 Rv2299c처리에 의해 수지상 세포의 성숙도가 증가하였음을 기능적으로 확인할 수 있었다.

실시예 7. Rv2299c에 의한 수지상 세포의 활성화에 있어 MAPK 및 NF- κ B의 영향 분석

Rv2299c에 의해 활성화된 수지상 세포가 MAPK 및 NF- κ B의 신호 전달 체계에 의해 유도되었는지를 알아보기 위해 U0126 (ERK1/2), SB203580 (p38), SP600125 (JNK), Bay 11-0782 (NF- κ B)와 같은 MAPK 및 NF- κ B 억제 물질을 이용하여 분석하였다. 수지상 세포에 MAPK 및 NF- κ B 억제 물질 1시간 동안 전 처리한 후 2 μ g/ml 농도의 Rv2299c 또는 대조군으로 100ng/ml의 LPS를 처리한 후 24 시간 동안 배양하였다. 수지상 세포의 표면인자 발현 영향분석을 위해 CD11c-FITC(BD bioscience)로 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 염색하였다. 이 후 항-CD80-PE(BD bioscience), 항-CD86-PE(BD bioscience)와 같은 세포 표면인자 항체를 이용하여 염색한 후 유세포 분석기FACs Canto (BD Biosciences)로 분석하였다(도면 6a).

또한 수지상 세포의 성숙 여부에 따라 분비되는 사이토카인을 분석하기 위해 상층액을 통하여 TNF- α , IL-6, IL-1 β 에 대한 ELISA 키트(BD PharMingen, USA)를 적용하여 사이토카인 분비량을 측정하였다 (도면 6b).

도면 6a에 나타난 바와 같이 MAPK 및 NF- κ B 억제 물질들은 Rv2299c에 의한 수지상 세포의 보조자극인자인 CD80과 CD86 발현을 감소시켰지만, 반면에 SP600125 (JNK)는 감소시키지 못했다. 또한 도면 6b에 나타난 바와 같이 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-6, IL-1 β 들을 감소시켰지만, 반면에 SP600125 (JNK)는 감소시키지 못했다. 이를 통해 Rv2299c에 의한 수지상세포의 활성화는 MAPKs (ERK1/2, p38) 및 NF- κ B 신호 전달 체계에 의존에 의해서 전 염증성 사이토카인의 생성을 유도한다는 것을 확인하였다.

실시예 8. Rv2299c에 의한 수지상 세포의 성숙과 TLR과의 연관성 분석

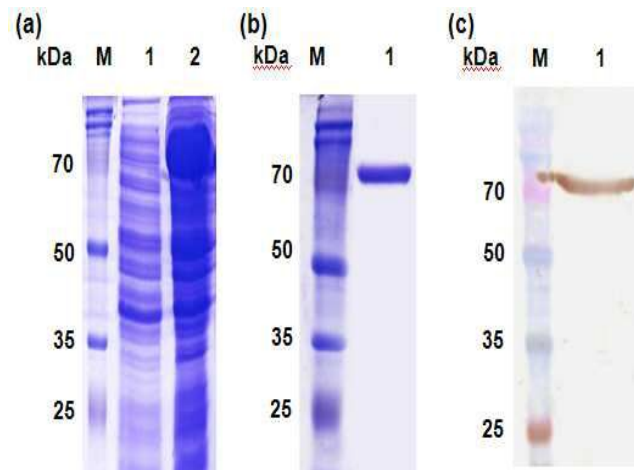
[0058] Rv2299c에 의한 수지상 세포의 성숙과 TLR의 연관성을 보기 위해서 TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-} 및 WT 마우스로부터 실시예 1과 같은 방법으로 수지상 세포를 분리하였다. 분리한 각 수지상 세포에 대하여 실시예 3과 같은 방법으로 CD86 및 MHC II의 발현을 측정하였으며, 실시예4와 같은 방법으로 TNF- α , IL-6, IL-1 β 의 생성 정도를 측정하였다. Rv2299c는 WT이나 TLR2^{-/-} 녹아웃 마우스의 골수에서 분리, 분화시킨 수지상 세포의 경우 CD86 및 MHC II의 발현과 TNF- α , IL-6, IL-1 β 의 생성을 크게 증가시켰지만, TLR4^{-/-}에서 분리한 수지상 세포의 경우 CD86 및 MHC II의 발현과 TNF- α , IL-6, IL-1 β 의 생성이 크게 감소하였다(도 7a).

[0059] 또한 TLR4^{-/-}의 하위 신호인 MyD88 또는 TRIF의 녹아웃 마우스를 이용해서 TNF- α , IL-6, IL-1 β 의 생성을 확인하였을 때 MyD88^{-/-}와 TRIF^{-/-}에서는 사이토카인 생성이 WT에 비해 감소하는 것을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과는 Rv2299c가 TLR4-MyD88/TRIF을 경유하여 수지상 세포를 활성화시켰음을 뒷받침해준다.

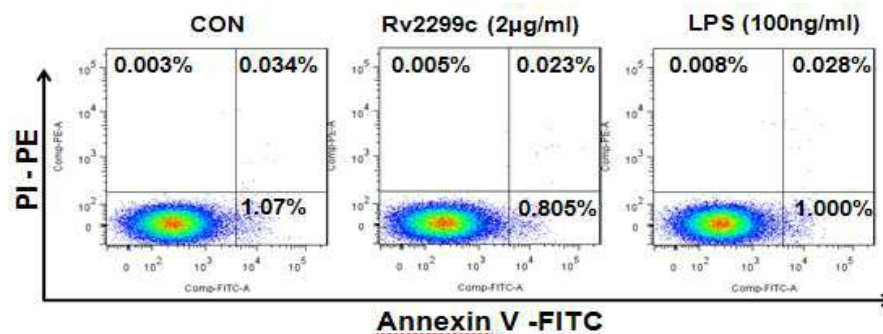
[0060] 이상 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시 예들을 설명하였지만, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 그 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

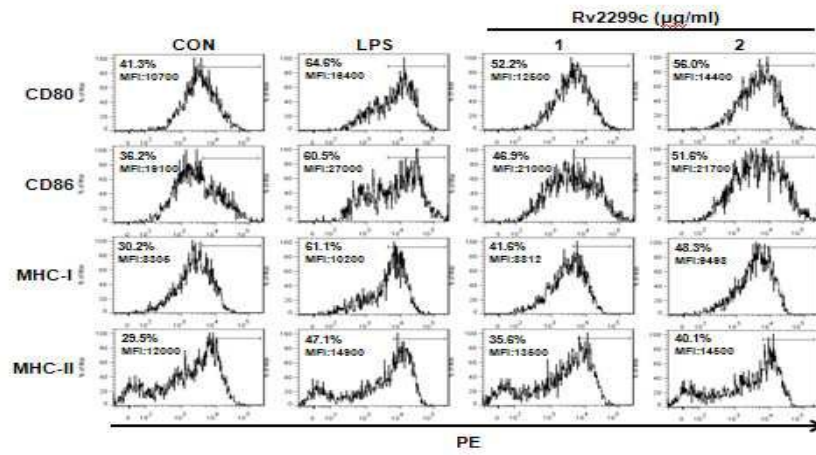
도면1a



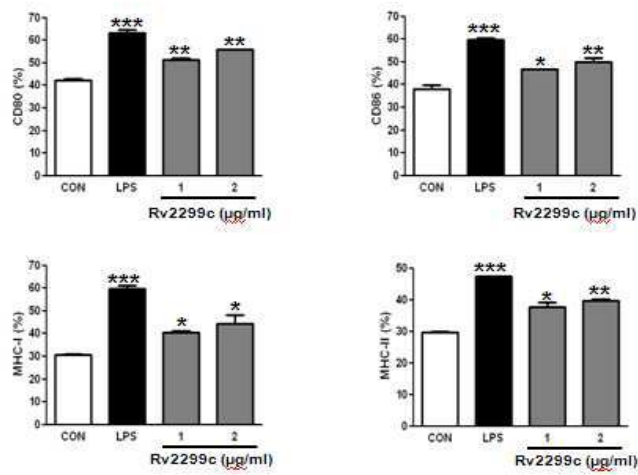
도면1b



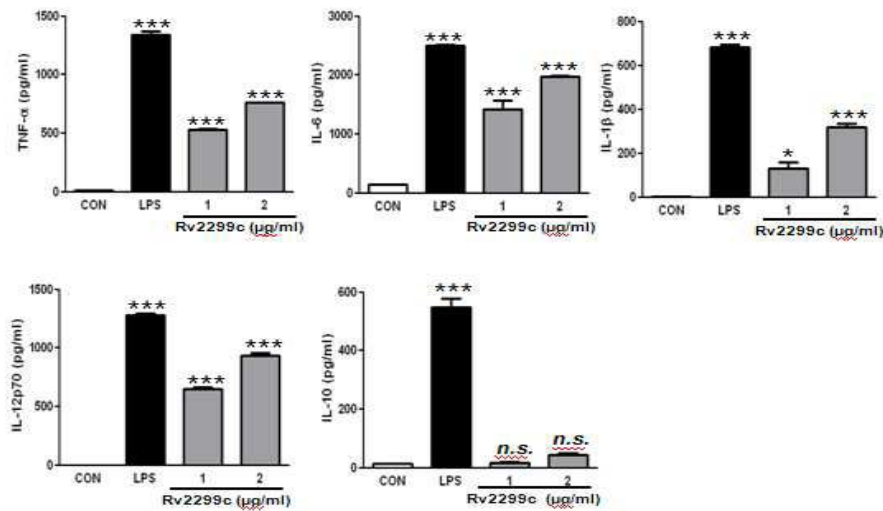
도면2a



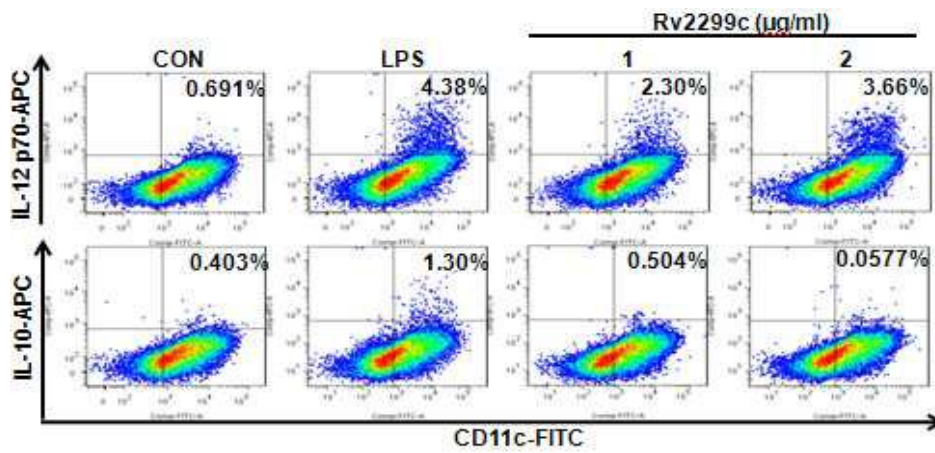
도면2b



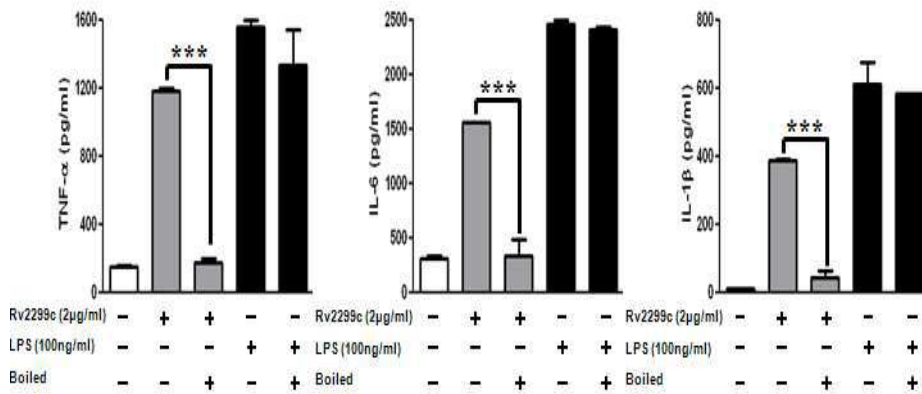
도면3a



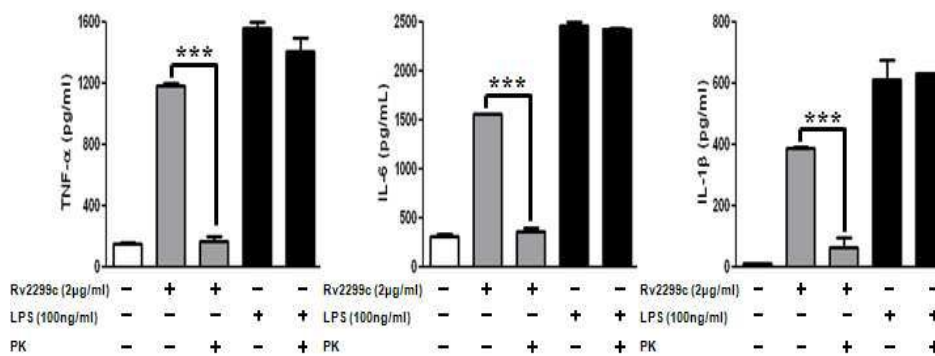
도면3b



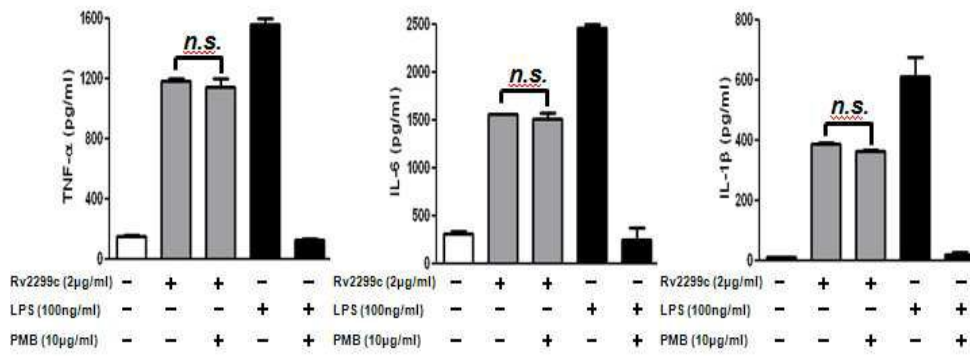
도면4a



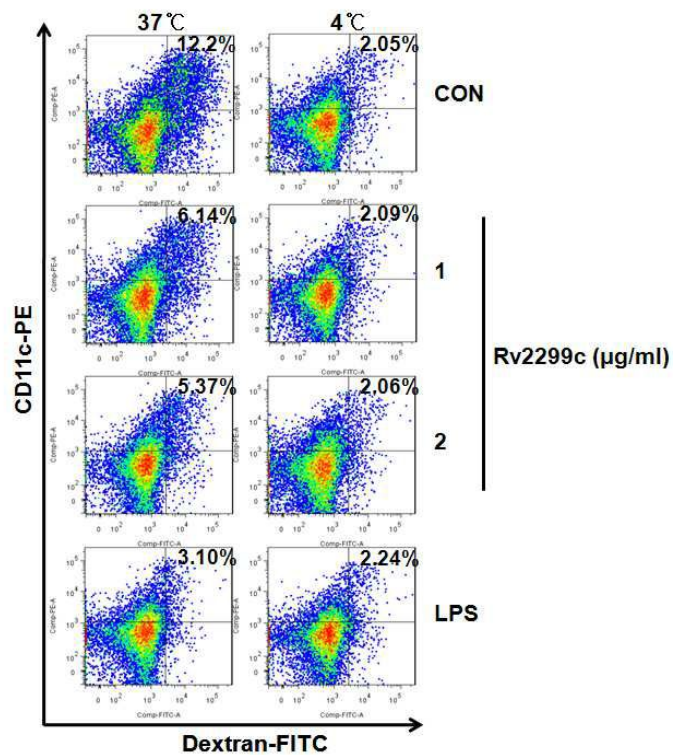
도면4b



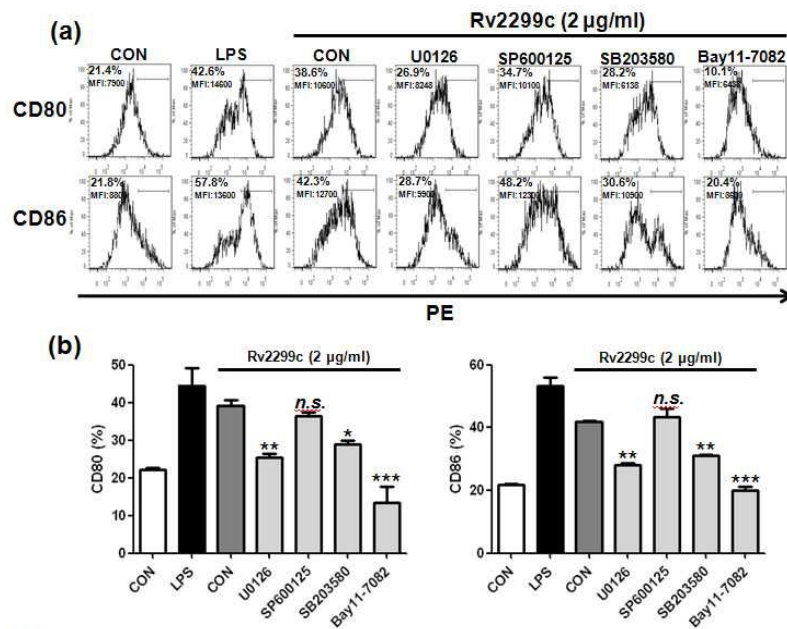
도면4c



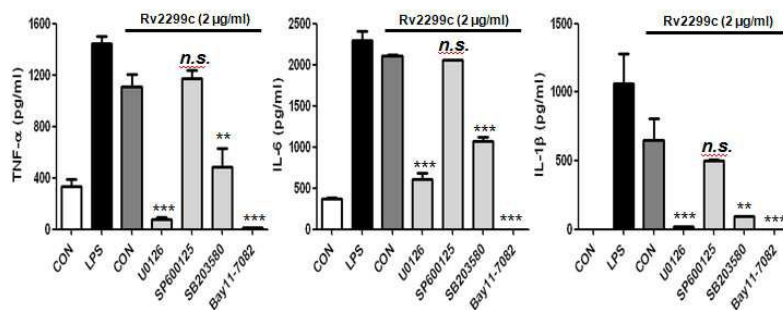
도면5



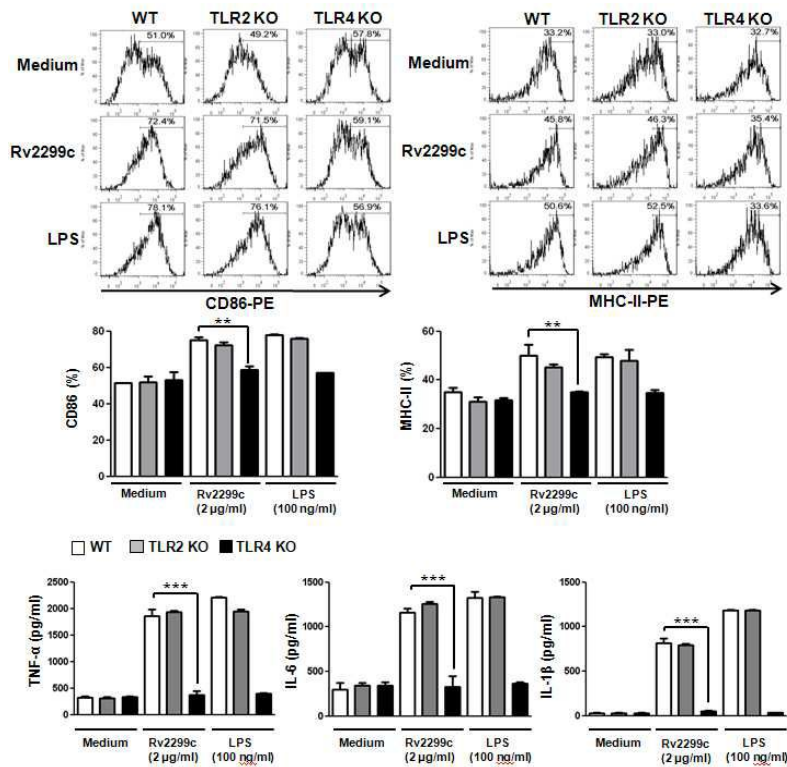
도면6a



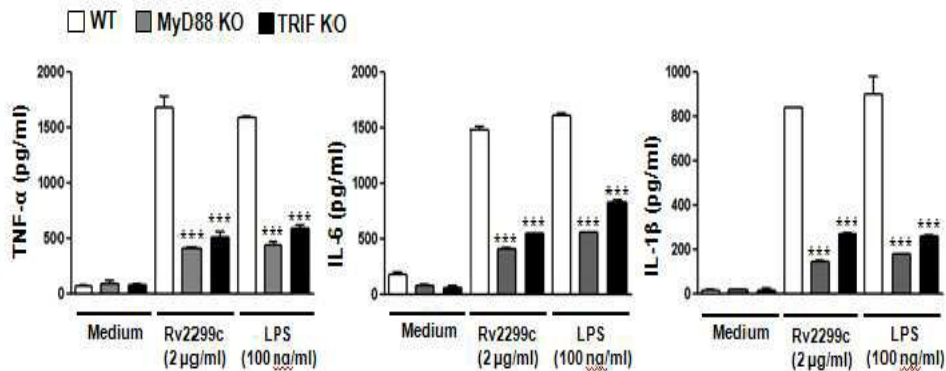
도면6b



도면7a



도면7b



서열 목록

- <110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
- <120> Maturation method for Dendritic cell using Mycobacterium tuberculosis Rv2299c
- <160> 2
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 25
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer

<400> 1

cgccatatga acgcccattgt cgagc

25

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer

<400> 2

cccaagcttc aaggtacgcg cgagacgttc

30