



- (51) 국제특허분류:
A61K 35/12 (2015.01) A61P 19/02 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/004043
- (22) 국제출원일: 2015년 4월 23일 (23.04.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2014-0049378 2014년 4월 24일 (24.04.2014) KR
10-2015-0056541 2015년 4월 22일 (22.04.2015) KR
- (71) 출원인: 성균관대학교산학협력단 (RESEARCH & BUSINESS FOUNDATION SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY) [KR/KR]; 440-746 경기도 수원시 장안구 서부로 2066, 성균관대학교내, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 배용수 (BAE, Yong-Soo); 440-200 경기도 장안구 수일로 205, 임광그대가아파트 107-1402, Gyeonggi-do (KR). 변세은 (BYEON, Se Eun); 441-400 경기도 수원시 권선구 곡선로 50 번길 22-5, 403 호, Gyeonggi-do (KR). 셀림아흐메드 (SELIM, Ahmed); 440-825 경기도 수원시 장안구 천전동 화산로 195-5, 103 호, Gyeonggi-do (KR). 정이들 (JEONG, Yideul); 448-728 경기도 용

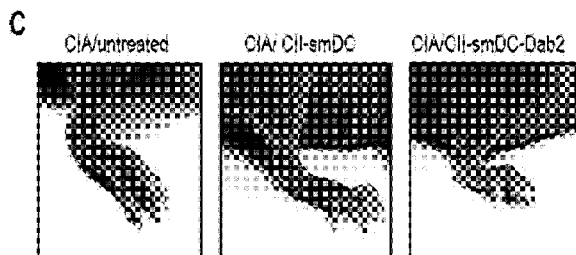
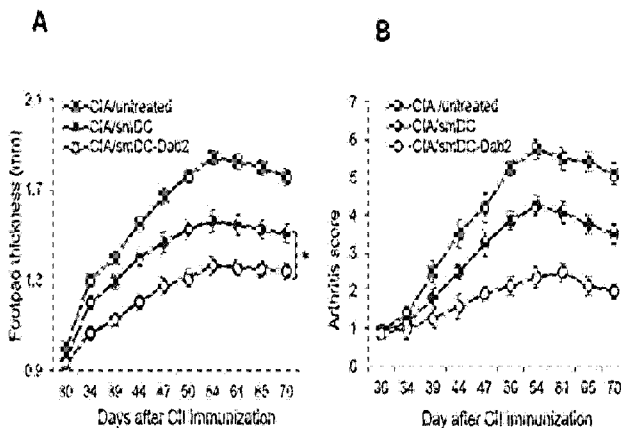
인시 수지구 수지로 75, 201 동 904 호 (상현동, 심곡마을 현대힐스테이트아파트), Gyeonggi-do (KR).

- (74) 대리인: 이명진 (LEE, Myoung-Jin); 135-846 서울시 강남구 영동대로 85 길 28, 6 층 (대치동), Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),

[다음 쪽 계속]

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING AUTOIMMUNE DISEASES, CONTAINING DENDRITIC CELLS WITH OVEREXPRESSED DAB2 GENE

(54) 발명의 명칭 : DAB2 유전자가 과발현된 수지상 세포를 포함하는 자가면역질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition for preventing or treating autoimmune diseases and, more specifically, to a pharmaceutical composition for preventing or treating autoimmune diseases, containing semi-mature dendritic cells with overexpressed Dab2 gene. The composition according to the present invention contains, as an active ingredient, semi-mature dendritic cells with overexpressed Dab2 gene or increased Dab2 protein activity. The semi-mature dendritic cells with overexpressed Dab2 gene or increased Dab2 protein activity can suppress the proliferation of antigen-specific effector T cells, inhibit the expression of inflammatory cytokines, and increase the proportion of anti-inflammatory cytokine expression and regulatory T cells, and thus are expected to be favorably used as a pharmaceutical composition for preventing, alleviating, or treating autoimmune diseases including arthritis.

(57) 요약서: 본 발명은 자가면역질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 Dab2 유전자가

[다음 쪽 계속]



OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, — 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

과발현된 준성숙 수지상세포를 포함하는 자가면역질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 조성물은 Dab2 유전자가 과발현 혹은 Dab2 단백질의 활성이 증가된 준성숙 수지상 세포를 유효성분으로 포함하고, Dab2 유전자가 과발현 혹은 Dab2 단백질의 활성이 증가된 준성숙 수지상세포는 항원 특이적인 활성 T 세포 (effect-or T cell) 증식을 억제하고, 염증성 사이토카인의 발현을 억제하며, 항염증성 사이토카인 발현 및 조절 T 세포 비율을 증가시킬 수 있는바, 관절염을 비롯한 자가면역질환을 예방, 개선 또는 치료를 위한 약학적 조성물로 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

명세서

발명의 명칭: DAB2 유전자가 과발현된 수지상 세포를 포함하는 자가면역질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 자가면역질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 Dab2 유전자가 과발현된 수지상 세포를 포함하는 자가면역질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 수지상세포는 T 세포 면역을 유도하지만, 때로는 성숙정도에 따라 T 세포면역을 조절하기도 한다. 수지상세포는 미성숙 상태에서 말초 조직이나 2차 림프기관에 존재하며, 미성숙 수지상세포는 일반적으로 조절 T 세포를 생성하거나 자가항원에 반응하는 effector T 세포의 불활화(anergy)나 세포자살(apoptosis)을 유도하여 자가항원에 대한 면역관용을 형성한다. 면역관용은 미성숙 수지상세포 뿐 아니라 준성숙한 수지상세포에 의해서도 유도된다. 반면 완전히 성숙한 수지상세포는 강한 면역을 유도한다. in vitro에서 생성된 준성숙 수지상세포는 미성숙수지상세포에 TNF- α 를 단기간 처리할 때 생성되며, 이것을 마우스 꼬리 정맥으로 투여했을 때, CD4+ Treg을 유도함으로써 Th1 의존적인 EAE를 예방할 수 있다고 보고되었다.
- [3] CD4+CD25+ 조절 T세포는 suppressor T 세포 중 하나이며, 이것은 말초 면역관용에 중요하게 작용한다. 최근 Foxp3 (forkhead box P3) 전사인자는 활성화된 CD4+ T 세포로부터 자연적으로 발생하는 CD4+CD25+ 조절 T세포에 특이적으로 발현하는 것으로 보고되어 있다. 자연적으로 발생한 조절 T 세포의 특이적인 분자 마커로써 Foxp3을 이용하여, CD4+CD25+Foxp3+ 조절 T 세포가 면역반응의 변화를 음성적으로 조절하는 것에 관여하며, 이것은 자가면역 질환을 예방하고 치료하는 것뿐만 아니라, 장기이식에 대한 면역관용과 같은 비자기 항원에 대한 면역관용 유도, 알러지나 감염성 질병과 같은 과도한 면역반응에 대한 음성적 조절에도 관여한다. 또한, transforming growth factor- β (TGF- β)는 T 세포의 증식과 CD4+ 와 CD8+ T 세포의 effector cell로 분화를 억제한다고 보고되어 있으며, 마우스와 사람에서 CD4+CD25+ 조절 T 세포의 유도와 유지에도 필수적이다. 국부적으로 면역관용 수지상 세포(DC)는 조절 T 세포 (Treg 세포)활성화를 통해 면역억제 혹은 면역관용 기전을 담당하며 이 경우 인터루킨 10 (IL - 10) 또는 TGF- β 와 같은 사이토카인 발현으로 Treg 세포의 활성을 조절한다.
- [4] 한편, Dab2(disabled-2) 유전자는 몇몇 수용체를 통한 신호전달 기전 및 엔도사이토시스에 관여하는 어답터 단백질로 잘 알려져 있다. Dab2 단백질은 N-말단에 저밀도 리포단백질 수용체 (LDL receptor) 및 TGF- β 수용체와 같은 막

단백질과 결합하는 포스포타이로신 결합 도메인을 가지고 있다. 또한 Dab2는 C-말단에 Grb2 같은 SH3 도메인을 가진 단백질과도 결합할 수 있는 프롤린 리치 도메인(PRD)을 포함하고 있다. Dab2 유전자는 두 종류의 단백질 (P96와 P67)을 발현한다. 주된 형태인 P96 Dab2 단백질은 성인에서 발현되는 반면, P67 단백질은 배아 발달과정 동안 주로 발현된다.

- [5] 또한, Dab2 단백질은 colony stimulating factor(CSF)와 TGF-beta에 의한 신호전달과정에서 인산화 되는 단백질로 serine 잔기에 인산화 된다고 알려져 있다. Dab2는 cdc2에 의해 세포주기가 진행되는 동안 인산화되며, Dab2 매개의 세포 성장과 증식을 억제한다. 또한, Dab2는 TGF-beta와 transactivator인 Smad family사이의 TGF-beta signaling에 관여한다고 알려져 있다. 덧붙여서, Dab2는 EAE, EAN(experimental autoimmune neuritis)와 같은 몇몇 중추신경계에서 발생하는 자가면역질환 동물모델에서 신호전달을 중개하는 중요한 단백질로 보고되어 있으나, 그 명확한 기전은 아직까지 밝혀진 바가 없다.
- [6] 이제까지 관절염을 비롯한 자가면역질환 치료는 스테로이드나, 비스테로이드성 염증억제제 (NSAID), 사이토카인 억제제 (Actemra), 신호전달 억제제 (JAK3 inhibitor) 혹은 TNF- α 관련 항체 치료제가 주종을 이루었다. 그러나, 이러한 치료는 부작용이 따르고, 완치가 어려워 자가면역질환의 근본적인 치료법은 되지 못하는 실정이다. 대부분의 자가면역질환은 그 원인 및 발병 기전이 분명하지 않고 매우 다양하여 치료가 어려우며, 현재 사용하고 있는 치료제들의 경우 장기간 투약 시 내성이 생기거나 부작용이 심각하여 새로운 근치적 치료제 개발이 절실히 요구되는 실정이다. 이러한 가운데 최근 연구 개발되고 있는 준성숙 수지상 세포를 이용한 류마티스 관절염 치료제(국내등록특허 10-088756 참조)는 기존의 어떠한 치료제보다 환자 지향적이며, 기억면역에 의해 장기적으로 효능을 볼 수 있어 범용성 염증반응 억제제가 아닌 항원 특이적인 근원적인 치료법이므로 부작용이 적고 재발 방지에 매우 효과적이며 안전하여 새로운 자가면역질환 면역치료법으로 기대된다. 그러나 이러한 준성숙 수지상세포의 경우도 투여량이 증가되면 면역관용보다 오히려 면역을 유도하여 관절염이 심해지는 현상이 보고되었다. 그러므로 이러한 준성숙 수지상세포에서 면역관용에 관여하는 유전자를 과발현시켜 면역관용 능력을 향상시킬 수 있다면 보다 강력하고 안정적인 자가면역질환 치료용 수지상세포 치료제가 개발될 수 있을 것이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명은 상기와 같은 종래 수지상세포 자가면역질환 치료백신의 치료효과의 한계 등 기술상의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 본 발명은 Dab2 유전자의 과발현 또는 Dab2 단백질의 활성이 증가된 수지상 세포를 유효성분으로 포함하는 관절염 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는

것을 그 목적으로 한다.

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

과제 해결 수단

- [9] 본 발명은 Dab2 유전자의 과발현 또는 Dab2 단백질의 활성이 증가된 수지상 세포를 유효성분으로 포함하는 자가면역질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [10] 본 발명의 일 구현예로, 상기 수지상 세포는 준성숙 수지상세포인 것을 특징으로 한다.
- [11] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 Dab2 유전자의 과발현은 상기 Dab2 유전자가 함유된 발현 벡터에 의해 이루어지는 것을 특징으로 한다.
- [12] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 Dab2 유전자의 과발현은 수지상 세포 내 Dab2의 과발현을 유도할 수 있는 사이토카인, 성장인자, 케모카인, 비타민 D, 항체 또는 신호전달 활성화 약물에 의해 이루어지는 것을 특징으로 한다.
- [13] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 Dab2 단백질의 활성 증가는 상기 Dab2 단백질에 상보적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 기질유사체 또는 앵타머에 의해 이루어지는 것을 특징으로 한다.
- [14] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 Dab2 단백질의 활성 증가는 Dab2 활성억제인자 (antagonist)와 결합하는 화합물 펩티드, 펩티드 미메틱스, 기질유사체, 앵타머 또는 항체에 의해 이루어지는 것을 특징으로 한다.
- [15] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 Dab2 유전자가 과발현된 수지상 세포에서는 MHCII, CD80, CD86 또는 CD40의 발현이 감소되는 것을 특징으로 한다.
- [16] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 조성물은 T 세포 증식을 억제하는 것을 특징으로 한다.
- [17] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 조성물은 항원 특이적 조절 T 세포 (Treg)를 증가시키는 것을 특징으로 한다.
- [18] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 자가면역질환은 류마티스 관절염, 염증성 대장염, 전신성 경피증, 홍반성 낭창, 아토피 피부염, 베체씨병, 쇼그렌 증후군, 다발성 경화증 및 그레이브씨 갑상선 항진증으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 한다.
- [19] 더욱이, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 자가면역질환 치료방법을 제공한다.
- [20] 뿐만 아니라, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 자가면역질환 예방 또는 치료에 이용하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [21] 본 발명에 따른 조성물은 Dab2 유전자가 과발현 혹은 Dab2 단백질의 활성이

증가된 준성숙 수지상 세포를 유효성분으로 포함하고, Dab2 유전자가 과발현 혹은 Dab2 단백질의 활성이 증가된 수지상 세포는 염증반응을 억제할 수 있는 항원 특이적 조절 T 세포 및 항염증성 사이토카인 발현이 향상될 뿐만 아니라, 염증성 사이토카인 및 염증반응 관련 T 세포 증식을 억제시킬 수 있는바, 관절염을 비롯한 자가면역질환의 예방, 개선 또는 치료하기 위한 약학적 조성물로 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [22] 도 1은 Dab2가 과발현된 준성숙 수지상 세포의 표현형을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [23] 도 2는 Dab2 과발현에 의한 준성숙 수지상 세포의 사이토카인 분비 증감을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [24] 도 3은 Dab2 과발현 준성숙 수지상세포와 항원 특이적 T 세포와 공배양 후 수지상세포에 의해 형성된 T 세포 콜로니를 현미경으로 촬영한 결과를 나타낸 것이다.
- [25] 도 4는 Dab2 과발현 준성숙 수지상세포와 항원 특이적 T 세포와 공배양 후 증폭된 T 세포를 MTT assay로 정량화한 결과를 나타낸 것이다.
- [26] 도 5는 Dab2 과발현 수지상세포와 Dab2 정상 수지상세포를 OVA₃₂₄₋₃₃₉ 펩타이드로 처리한 후 T세포와 공배양 한 후 (A)는 증식된 T 세포를 형광유세포분석기로 분석한 결과 (B)는 T 세포와 준성숙 수지상세포의 비율을 달리하여 공배양 하고 이를 3 차례 반복하여 통계처리한 결과를 나타낸 것이다.
- [27] 도 6은 Dab2 과발현 준성숙 수지상세포와 T 세포를 공배양한 배양액에서 T세포가 분비한 사이토카인을 측정된 결과를 나타낸 것이다.
- [28] 도 7은 Dab2 과발현 준성숙 수지상세포백신 (CII-smDC-Dab2)에 의한 조절 T 세포 개체수 증가 여부를 FACS 분석으로 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [29] 도 8은 제2형 콜라겐에 의해 유도된 관절염 발병초기 CIA 마우스 모델에서 Dab2 과발현된 준성숙 수지상세포를 이용하여 치료를 진행한 후 (A)는 마우스 발 두께 측정 결과, (B)는 관절염 증상 정도 측정 결과, (C)는 수지상세포백신 치료 후 마우스의 발 상태를 촬영한 사진 결과를 나타낸 것이다.
- [30] 도 9는 관절염 유도 모델에서 Dab2 과발현 준성숙 수지상세포백신으로 치료 시 투여받은 마우스에서 조절 T 세포의 증가를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [31] 본 발명에서, Dab2 유전자 과발현(over-expression) 실험을 통해 준성숙 수지상세포의 in vitro 면역억제능과, 관절염 마우스에서 관절염치료 효능 등을 조사하였다. 그 결과 Dab2를 과발현한 준성숙 수지상세포의 경우 염증억제 관련 사이토카인 및 조절 T세포 유도능이 증가하였으며, 면역유도관련 세포표면항원, 염증성 사이토카인, T 세포 증식능, 관절염 수치 등이 일관성 있고 통계적으로 유의미하게 감소됨을 확인하였다. 이러한 결과는 Dab2가 준성숙 수지상세포의

면역관용기전에 중요하게 작용하고 있음을 시사하며, Dab2 유전자를 과발현 시킴으로써 자가면역질환에 대해 보다 효과적인 준성숙 수지상세포치료제를 개발할 수 있음을 새롭게 발견하고, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.

[32]

[33] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[34]

[35] 본 발명은 Dab2 유전자의 과발현 또는 Dab2 단백질의 활성이 증가된 수지상 세포를 유효성분으로 포함하는 자가면역질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[36]

본 명세서에서 용어 "수지상 세포(dendritic cell)"는 항원을 세포내부로 흡수하고 이를 처리하여 항원 또는 항원으로부터 유래된 펩타이드를 MHC (major histocompatibility complex) 클래스 I 복합체 또는 MHC 클래스 II 복합체와 함께 제시하는 전문적 항원 제시 세포(professional antigen presenting cell)를 의미한다. 수지상 세포는 성숙도에 따라 미성숙 수지상세포(immature dendritic cells; "imDC"), 준성숙 수지상세포(semimature dendritic cells; "smDC") 및 성숙 수지상세포(mature dendritic cells; "mDC")로 분류할 수 있는데, 본 발명에서, Dab2 유전자의 과발현 또는 Dab2 단백질의 활성이 증가된 수지상 세포는 바람직하게는 준성숙 수지상세포일 수 있다.

[37]

본 명세서에서 용어 "준성숙 수지상세포"는 미성숙 수지상세포의 특성의 일부를 상실하고, 성숙 수지상 세포의 표현형의 일부 특성을 갖는 수지상 세포로서, 부분적으로(partially) 또는 불완전하게(incompletely) 성숙된 형태 및 표현형적 특성을 나타내는 수지상세포를 의미한다. 준성숙 수지상세포는 일반적으로 자가-항원(self-antigen)에 대응하여 면역관용 반응을 유도하는 능력을 갖는다. 수지상세포의 표면 마커의 발현 프로파일링은 당 업계에 공지된 유세포 분석을 통하여 용이하게 할 수 있다. 본 발명의 조성물에 포함되는 준성숙 수지상세포는 미성숙 수지상세포를 분화 유도시켜서 얻을 수 있다.

[38]

본 발명에서 사용되는 용어, "예방"이란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 자가면역질환을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[39]

본 발명에서 사용되는 용어, "치료"란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 자가면역질환 증세가 호전되거나 진행을 정지시키는 모든 행위를 의미한다.

[40]

본 발명의 조성물에 의한 개선, 예방 또는 치료 대상 질병인 "자가면역질환"은 자기의 장기조직이나 그 성분에 대해 항체가 생산되는 염증성 질환으로 많은 조직과 장기에 만성적인 전신적 염증을 일으키는 특성을 갖는 질병을 총칭하는 의미로서, 본 명세서에서 자가면역질환에는 류마티스 관절염, 염증성 대장염, 전신성 경피증, 홍반성 낭창, 아토피 피부염, 베체씨병, 쇼그렌 증후군, 다발성 경화증 및 그레이브씨 갑상선 항진증 등이 포함되지만, 이에 한정되는 것은

아니다.

- [41] 본 발명에서, 상기 Dab2 단백질은 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어질 수 있으며, 이에 한정되지 않고 상기 아미노산 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열로 표시되는 단백질을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명에서, 상기 Dab2 유전자는 서열번호 5의 염기서열로 이루어질 수 있으나, 이에 한정되지 않고 Dab2 단백질을 코딩할 수 있는 어떤 유전자도 가능하다.
- [42] 본 발명에서, 준성숙 수지상 세포에서의 Dab2 단백질의 과발현은 Dab2 유전자의 발현을 증가시키거나 기타 약물처리로 Dab2 단백질의 활성이 증가되는 것으로 이루어질 수 있다. Dab2 유전자의 과발현은 Dab2 유전자가 함유된 발현 벡터에 의해 이루어질 수 있으며, 보다 구체적으로, Dab2 유전자의 cDNA를 사람 elongation factor 1 α -subunit (hEF-1 α) 프로모터를 발현하는 pcDNA3.1 플라스미드 벡터나 바이러스 벡터에 삽입하고 이 재조합 플라스미드나 바이러스를 수지상세포에 형질전환 또는 형질감염 시키는 것에 의해 이루어질 수 있다. 또한, Dab2 유전자의 과발현은 수지상 세포 내 Dab2의 과발현을 유도할 수 있는 사이토카인, 성장인자, 케모카인, 비타민 D, 항체 또는 신호전달 활성화 약물에 의해서도 이루어질 수 있다. 즉, Dab2는 GM-CSF, TGF- β IL-2 등과 같은 cytokine에 의해 발현이 증가될 수 있다. GM-CSF는 JAK/STAT, Ras/MAPK, PI3K/Akt 같은 신호전달 과정을 거쳐 수지상세포의 분화를 유도하며 이 신호전달 과정은 NF κ B를 활성화시켜 Dab2 발현을 증가시킬 수 있다. 또한 TGF- β 나 IL-2는 Smad 와 STAT5 신호전달 과정을 통해 FoxP3 발현을 유도하고 FoxP3은 Dab2 promoter에 작동하여 Dab2 발현을 증가시킬 수 있다. 또한 정상 상태의 세포에서는 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein E1 (hnRNP E1) 단백질이 Dab2 mRNA 3'-말단의 33-nucleotide TGF- β -activated translation (BAT) element에 결합하여 Dab2의 단백질 번역과정을 억제하므로 Dab2 mRNA의 발현이 억제될 수 있다. 그러나 TGF- β 를 세포에 처리하면 TGF- β 수용체 신호가 활성화되고 PKB β /Akt2 가 활성화되어 hnRNP E1을 인산화시켜 BAT element에서 떨어져 나가고 Dab2 mRNA가 translation되어 Dab2 단백질 발현이 증가하게 된다. 또한 vitamin D 처리에 의해 ViD receptor 가 활성화 되면 Foxp3 발현이 증가할 수 있다. 그 외에도 세포 내의 STAT5, PKB/AKT, Ras/MAPK를 활성화시키는 약물 처리시 Dab2 발현이 높아질 수 있다.
- [43] 뿐만 아니라, Dab2 단백질의 활성 증가는 Dab2 단백질에 상보적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 기질유사체 또는 앵타머에 의해 이루어지거나, Dab2 활성억제인자 (antagonist)와 결합하는 화합물 펩티드, 펩티드 미메틱스, 기질유사체, 앵타머 또는 항체에 의해 이루어질 수 있다.
- [44] 본 발명에서 수지상 세포는 인간 또는 마우스 유래일 수 있으며, 바람직하게는 인간 혈액으로부터 수지상 세포를 분리하거나 혈액으로부터 분리된 단핵구 또는 마우스 골수로부터 분리된 골수 줄기세포로부터 수지상 세포로 분화시킬

수 있다.

- [45] 본 발명의 일 실시예에서는 마우스의 골수 또는 비장으로부터 수지상 세포를 분화시키는 과정에서(실시예 1 참조) Dab2의 cDNA를 발현하는 플라스미드 벡터를 사용하여 준성숙 수지상 세포에서 Dab2 유전자를 과발현시킨 후 (실시예 2 참조), 표현형 및 기능 변화를 확인한 결과, Dab2가 과발현된 수지상 세포에서 T 세포를 활성화 시키는데 중요한 MHCII, CD80, CD86, CD40의 발현이 감소되었다 (실시예 3 참조).
- [46] 또한, 본 발명의 다른 실시예에서는 Dab2의 과발현에 의한 준성숙 수지상 세포의 사이토카인 분비능을 확인한 결과, Dab2가 과발현된 준성숙 수지상 세포에서 IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α 와 같은 염증성 사이토카인의 분비가 감소하였고, 항염증성 사이토카인인 IL-10의 분비는 증가하였다 (실시예 4 참조).
- [47] 더욱이, 본 발명의 또 다른 실시예에서는 Dab2 과발현 준성숙 수지상세포의 T 세포와 공배양 시 T 세포 증식억제 효능증가를 확인한 결과, Dab2 과발현 준성숙 수지상세포의 경우가 Dab2 정상인 대조군 준성숙 수지상세포 보다 T 세포 증식이 효과적으로 억제될 뿐만 아니라, 조절 T 세포 (Treg)의 비율도 현저히 증가하였다(실시예 5 참조).
- [48] 뿐만 아니라, 본 발명의 또 다른 실시예에서는 Dab2가 과발현된 준성숙 수지상 세포를 이용한 관절염치료 효능을 확인한 결과, 제2형 콜라겐에 의해 유도된 관절염 마우스모델에서 제2형 콜라겐을 감작시킨 Dab2-과발현 준성숙 수지상 세포 (CII-smDC-Dab2)가 콜라겐을 감작시킨 대조군 준성숙 수지상세포(CII-smDC)보다 더 효과적으로 관절염 치료효과를 보였다 (실시예 6 참조).
- [49] 본 발명의 약학적 조성물은 Dab2 유전자의 과발현 및 Dab2 단백질의 활성이 증가된 모든 종류의 수지상 세포와 함께 자가면역질환 치료 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 더 함유할 수 있다. 또한 Dab2 유전자의 과발현은 외부에서 유전자도입 뿐 아니라 다른 약물처리에 의한 내부 유전자의 발현 증가도 포함한다.
- [50] 본 발명의 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 또한 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [51] 상기 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 덱스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등이 있다. 상기 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는

부형제를 사용하여 조제된다.

- [52] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

- [53] 구체적으로, 본 발명에 따른 약학적 조성물의 유효량은 환자의 연령, 성별, 상태, 체중, 체내에서 활성 성분의 흡수도, 불활성을 및 배설속도, 질병종류, 병용되는 약물에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 최소 2주에서 최장 12개월 간격으로 최소 1회에서 최고 20회 혹은 그 이상 투여할 수 있으며, 1회 투여 시 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^8$ 세포를 환자 및 투여경로에 따라 양을 달리하여 투여할 수 있으며, 하루에 한번 또는 수 회 나누어 투여할 수도 있다.

- [54] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 피하, 정맥, 근육 또는, 또는 복강 내 주사에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 질환의 중증도 등의 여러 관련 인자와 함께, 활성성분인 약물의 종류에 따라 결정된다.

- [55] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 자가면역질환 치료방법을 제공한다. 본 발명에서 "개체"란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐 (mouse), 쥐 (rat), 개, 고양이, 말 및 소 등의 포유류를 의미한다.

[56]

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

[58]

[59] **[실시예]**

[60] **실시예 1. 실험준비**

[61] **1-1. 수지상 세포 제조**

- [62] 수지상 세포(DC)는 골수줄기세포 (bone marrow stem cells)를 수지상세포로 분화시켜 배양하였다. 보다 구체적으로, 골수 유래 수지상 세포 (Bone

marrow-derived DC, BM-DC)는 6-8주령 female DBA1 마우스의 대퇴골과 경골로부터 골수 세포를 분리한 후, 적혈구를 제거하기 위해 ACK lysis buffer (Lonza)를 처리하였다. 세포를 세척하고 10 ng/ml mGM-CSF (Creagene Inc.)를 포함하는 세포 배양배지 (10% FBS와 penicillin/streptomycin이 포함된 RPMI 1640)로 배양하였다. 2일 후, 배양된 세포의 상층액을 제거한 후 mGM-CSF가 포함된 새로운 배양배지 2 ml로 교체하였다. 배양 4일째, mGM-CSF가 포함된 새로운 배양배지 1 ml을 첨가하였다. 배양 6일째, 비접착성 세포들을 수거하여 미성숙 수지상세포 (immature DCs, imDC)로 사용하였다. 준성숙 수지상세포(semi-mature DC, smDC)는 미성숙 수지상 세포(imature DC)를 TNF- α (500 U/ml) 존재 하에 4 시간 동안 배양하여 준비하였다.

[63]

[64] 1-2. 통계분석

[65] 모든 실험은 일관된 결과로 적어도 세 번의 실험을 반복하였다. 통계학적인 데이터는 mean $\pm$ SD로 표현하였다. 각 그룹 간 평균 비교는 Student's t-test로 평가하였다. 0.05보다 적은 P-value ($p < 0.05$)를 보일 때 통계적 유의성이 있다고 평가하였다.

[66]

[67] 실시예 2. 수지상 세포에서 Dab2 유전자의 과발현

[68] Dab2 유전자가 과발현된 수지상 세포를 하기와 같은 방법으로 준비하였다. 즉, Total RNA는 TRIzol (Invitrogen)를 이용하여 세포로부터 정제하였다. cDNA는 RevertAid™ H Minus Reverse transcriptase 와 Oligo dT primers (Fermentas)를 이용하여 합성하였다. 마우스 Dab2 유전자 p96을 Dab2 p96 primer (Forward primer : 5'-ATG TCT AAC GAA GTA GAA ACA AGC ACA ACC-3'(서열번호 1), Reverse primer : 5'-TAG GCA AAA GGA TTT CCG AAA GGG CTC CTG-3'(서열번호 2))로 Maxime pfu PCR kit (iNtRON Biotechnology, Inc.)를 이용하여 PCR을 진행하였다. PCR로 증폭된 DNA를 pEF-Myc/His 플라스미드 벡터에 클로닝하여 Dab2를 발현하는 재조합 플라스미드(pEF-Myc/Dab2)를 제작하였고, 대조군으로 pcDNA3.1 벡터를 사용하였다.

[69] Lipofectamine 2000/Gene porter transfection kit (Life Technologies)와 kit에 제공된 방법을 이용하여 pEF-Myc/Dab2 또는 pcDNA3.1을 Day 4 또는 Day 5의 수지상 세포(DC) 전구세포에 형질전환 하였다. 상온에서 20분 동안 배양한 후, 200 μ l의 혼합액을 2 ml의 수지상 세포(DC) 배양액에 첨가하였다. 4시간 배양 후, 10% FBS가 포함된 RPMI1640을 같은 양 첨가하고 24-48시간 배양하였다. 배양 후 세포를 세척하고 Dab2 과발현 미성숙 수지상세포 (imDC/Dab2)에 TNF- α 500 U/ml을 4시간 동안 처리하여 준성숙 수지상세포로 분화시켜 이후 실험에 사용하였다. 제2형 콜라겐 (type II collagen)은 50 μ g/ml 농도로 TNF- α 처리와 동시에 진행하였다.

[70]

[71] 실시예 3. Dab2 과발현에 의한 수지상 세포의 표현형 확인

[72] 세포의 표현형을 분석하기 위해, 형광이 표지된 항체를 사용하였다. 세포는 다음과 같은 항체들로 4°C에서 20분 동안 FACS buffer에서 염색 되었다 : FITC-labeled rat anti-mouse CD14(rmC5-3), anti-mouse CD86(GL1), anti-mouse I-A/I-E(2G9), anti-mouse MHCI(H-2K^d), PE-labeled hamster anti-mouse CD11c (HL3), anti-mouse CD80(16-10A1), rat anti-mouse-CD40(3/23) (BD Pharmingen), FITC-labeled isotype control antibodies. 세포 세척 후, 세포는 FACS Calibur (BD) using CellQuest 또는 FlowJo software를 이용하여 분석하였고, 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[73] 도 1에 나타낸 바와 같이, Dab2가 과발현된 수지상 세포에서 T 세포를 활성화 시키는데 중요한 MHCII, CD80, CD86, CD40의 발현이 감소됨을 확인할 수 있었다.

[74]

[75] 실시예 4. Dab2 과발현에 의한 수지상 세포의 사이토카인 분비능 변화 확인

[76] Dab2가 과발현된 준성숙 수지상 세포로부터 분비되는 염증성 사이토카인 발현의 증감을 control 벡터 (pcDNA3.1)를 형질전환한 준성숙 수지상 세포와 비교하였다. 보다 구체적으로, 골수유래 준성숙 수지상 세포에서 분비된 사이토카인은 배양한 상층액에서 IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p70, TNF- α ELISA kit를 이용하여 검출하였고, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[77] 도 2에 나타낸 바와 같이, Dab2가 과발현된 준성숙 수지상 세포는 염증반응을 유도하는 IL-12 및 IL-6의 분비가 통계적으로 유의미하게 감소함을 확인할 수 있었다. 또한 항염증성 사이토카인인 IL-10의 분비가 Dab2가 과발현된 준성숙 수지상세포 (DC)에서 통계적으로 유의미하게 감소함을 확인할 수 있었다. 이는 Dab2가 과발현된 준성숙 수지상 세포가 염증반응을 더 효과적으로 억제할 수 있음을 시사한다.

[78]

[79] 실시예 5. Dab2 과발현 준성숙 수지상세포의 T 세포와 공배양 시 T 세포 증식억제 효능증가 확인[80] 5-1. Dab2 과발현 준성숙 수지상세포 (DC)의 T 세포 증식활성 억제 확인

[81] Dab2 과발현 준성숙 수지상세포 (DC)의 T 세포 증식활성 억제 여부를 조사하기 위해 하기와 같이 실험을 실시하였다.

[82] 먼저, Dab2 과발현된 준성숙 수지상 세포 (smDC-Dab2)와 Dab2 정상 준성숙 수지상세포 (smDC)를 각각 OT-2 T 세포와 공배양한 후 T 세포 증식을 정량하기 위해 colony 형성 assay 와 MTT assay를 수행하였다. Dab2 과발현 수지상세포와 Dab2 정상 수지상세포를 OVA₃₂₄₋₃₃₉(ISQAVHAAHAEINEAGR)(서열번호 3) 펩타이드로 1시간 처리한 후 OT-2 마우스 비장에서 nylon wool columns (Poly Sciences, Warrington, PA, USA)으로 분리한 OT-2 T 세포와 1:10 비율로 3일간 공배양 하였다. 도 3은 공배양 3일째 수지상세포에 의해 형성된 T 세포 콜로니를

현미경으로 촬영한 것으로 Dab2 과발현 준성숙 수지상세포에 의해 형성된 콜로니가 Dab2 정상인 대조군 수지상세포에 의해 형성된 콜로니보다 현저히 작은 것을 확인할 수 있었다.

[83] 또한 이렇게 증폭된 T 세포를 MTT

[3-(4,4-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay로 정량하였다. MTT assay 는 3일간 공배양한 세포에 MTT 용액 20 μ l/well (5mg/ml)를 첨가하여 4시간 반응시킨 다음 실온에서 안정화 용액을 첨가하여 반응을 종결시키고 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하였고, 그 결과를 도 4에 나타내었다. 도 4에 나타낸 바와 같이, Dab2 과발현 준성숙 수지상세포가 Dab2 정상인 대조군 수지상세포보다 T 세포 증식력이 현저히 감소함을 확인할 수 있었다.

[84]

[85] 다음으로, Dab2 과발현 준성숙 수지상세포에 의해 억제되는 CD4 T 세포의 증식 억제 활성을 보다 정확히 분석하기 위해 Dab2 과발현 수지상세포와 Dab2 정상 수지상세포를 OVA₃₂₄₋₃₃₉ 펩타이드로 처리한 후 CFSE (Carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester)로 1시간동안 표지된 OT-2 T세포와 3일간 공배양하고, 증식된 T 세포를 형광유세포분석기로 분석하였고, 그 결과를 도 5의 A에 나타내었다. 또한 OT-2 T 세포와 준성숙 수지상세포의 비율을 달리하여 공배양하고 이를 3 차례 반복하여 통계처리한 결과를 도 5의 B에 나타내었다. 도 5에 나타낸 바와 같이, Dab2 과발현 준성숙 수지상세포가 Dab2 정상인 대조군 준성숙 수지상세포보다 CD4 T 세포 증식억제능이 현저히 향상되었으며 이러한 증식 억제능 향상은 통계적으로 유의하게 나타남을 확인할 수 있었다.

[86]

[87] 5-2. Dab2 과발현 준성숙 수지상세포와 T 세포를 공배양한 배양액에서 T세포가 분비한 사이토카인 측정

[88] Dab2 과발현된 준성숙 수지상 세포 (smDC-Dab2)와 Dab2 정상 준성숙 수지상세포 (smDC)를 각각 CD4+ T 세포와 공배양시 T 세포에서 분비되는 사이토카인의 변화를 조사하여 준성숙 수지상세포에 의해 증식이 억제되는 T 세포를 CD4 T 세포 아군별로 분석하였다.

[89] 보다 구체적으로, Dab2 과발현된 준성숙 수지상 세포 (smDC-Dab2)와 Dab2 정상 준성숙 수지상세포 (smDC)를 OVA₃₂₄₋₃₃₉ 펩타이드로 1시간 처리한 후 OT-2 마우스의 비장에서 nylon wool columns (Poly Sciences, Warrington, PA, USA)으로 순수 분리한 OT-2 T 세포와 각각 1:10 비율로 섞어 3일간 공배양 하였다. 배양 3일 후 상층액에서 IFN- γ , IL-17A, IL-4, IL-10의 레벨을 ELISA kit (Biolegend)를 이용하여 측정하였고, 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[90] 도 6에 나타낸 바와 같이, Dab2가 과발현된 준성숙 수지상 세포와 T 세포 공배양 시 IL-10의 분비가 유의미하게 증가하였다. 또한 Th1 type의 사이토카인인 IFN- γ 와 자가면역질환과 같은 염증반응에 관여하는 것으로 알려진 Th17 type의 사이토카인인 IL-17이 유의미하게 감소하였다.

- [91] 상기 결과로부터, Dab2 과발현된 준성숙 수지상 세포가 Dab2 정상 준성숙 수지상세포보다 효과적으로 Th1/Th17 등의 CD4+ T 세포매개 염증반응을 억제하고 IL-10을 분비하는 조절 T 세포의 활성을 유도함을 알 수 있었다.

[92]

- [93] 5-3. Dab2 과발현 준성숙 수지상세포백신 (CII-smDC-Dab2)에 의한 조절 T 세포 개체수 증가 확인

- [94] Dab2 과발현 준성숙 수지상세포 (DC)의 조절 T 세포 증가 여부를 조사하기 위해 다음과 같은 실험을 진행하였다. DBA/1 마우스로부터 적출한 비장에서 비장세포를 분리한 후, Nylon wool을 이용하여 CD4+ T 세포를 분리하였다. 한편 2형 콜라겐과 LPS (100-200 ng/ml)를 24시간 처리하여 제조한 성숙 수지상세포 (CII-mDC)와 Dab2-과발현 준성숙 수지상세포 (CII-smDC-Dab2) 및 Dab2 정상 준성숙수지상세포 (CII-smDC-con)를 준비하고 이들 세포를 CFSE-로 표지된 T 세포(1×10^6)와 웰당 CFSE-T:mDC:smDC(smDC-Dab2 or smDC) = 10:1:1 혹은 5:1:1로 섞어 RPMI 배지에서 3 ~ 5일간 공배양 하였다. 이후 증식된 T 세포를 FACS로 분석하였다. 그 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이, smDC-Dab2가 smDC에 비해 mDC에 의해 활성화된 T 세포 증식을 더 효과적으로 억제하였고 Foxp3로 염색하여 조절 T 세포 (Treg)의 비율은 조사한 결과 smDC-Dab2 공배양에서 Treg이 현저히 증가함을 확인할 수 있었다.

[95]

- [96] 실시예 6. Dab2 과발현된 준성숙 수지상세포백신 (CII-smDC-Dab2)을 이용한 CIA 모델에서 관절염 치료 효능 확인

- [97] DBA/1 마우스의 꼬리의 피하(subcutaneously, s.c.)를 통해 0.05M acetic acid에 녹인 4mg/ml 제2형 콜라겐과 complete Freud's adjuvant (CFA)를 1:1 비율로 혼합한 에멀전 100 μ l를 주입하였다. Booster injection : 첫 번째 콜라겐 에멀전을 주입한 지 21일 후, 0.05M acetic acid에 녹인 4mg/ml 제2형 콜라겐과 incomplete Freud's adjuvant (IFA)를 1:1 비율로 혼합한 에멀전 100 μ l를 주입하였다. Booster injection은 CIA 형성을 유도하는데 필수적이며, 보통 첫 콜라겐 투여 후 30~34일 시점에 관절염 증상이 관찰된다. 준성숙 수지상세포에 의한 치료는 관절염 발병 전 모델 (첫 콜라겐 투약 후 20-22일 시점에서 치료시작)과 관절염 발병 초기모델 (콜라겐 첫 투약 후 30-31일 시점에서 치료시작)에서 진행하였다. 두 모델 모두에서 준성숙 수지상세포 백신치료는 DBA/1 마우스의 복부 피하에 2×10^5 개의 제2형 콜라겐이 제시된 준성숙 수지상세포를 주입하여 면역치료를 실시하였다.

- [98] 캘리퍼스(caliper)를 사용하여 1주일에 2회 발바닥 (footpad) 두께를 측정하여 Dab2 과발현된 준성숙 수지상세포의 관절염 치료 효능을 확인하였고, 그 결과를 도 8의 (A)에 나타내었다. 도 8의 (A)에 나타낸 바와 같이, 제2형 콜라겐을 처리한 Dab2-과발현 준성숙 수지상세포 (CII-smDC-Dab2)를 투여한 군이 대조군인 준성숙수지상세포(CII-smDC) 투여군보다 관절염 진행을 억제함을 확인할 수

있었다.

- [99] 또한, 관절염의 질병 활성 정도를 평가하기 위해 관3-점 스케일(three-point scale)을 이용하여 두 명의 관찰자에 의해 관절염 유도 후 27일에서 61일 사이에 주 2회 각 발의 관절염 중증도를 시각평가 하였다. 관절염의 위중도는 0-3 스케일(0은 정상 관절; 1은 약한 염증 및 적열상태; 2는 심각한 홍반 및 전체 발에 영향을 미치는 부기; 및 3은 관절 균음증, 관절 강직증, 및 기능상실을 가진 변형된 형태의 발 및 관절)에 기초해 평균 관절염 인덱스로 표현하였다. 객관적인 질병 활성도에 대한 전체 스코어는 모든 4개의 다리에 기초하여 각각의 마우스에 대해 최대 12 스코어를 갖도록 하였고, 그 결과를 도 8의 (B)에 나타내었다. 도 8의 (B)에 나타낸 바와 같이, 제2형 콜라겐을 처리한 Dab2-과발현 준성숙 수지상세포 (CII-smDC-Dab2)를 투여한 군이 대조군인 준성숙수지상세포(CII-smDC) 투여군보다 통계적으로 유의미하게 관절염 진행을 억제함을 확인할 수 있었다. 한편, 수지상세포백신 치료 후 마우스의 발 상태를 촬영한 사진 결과를 도 8의 (C)에 나타내었다.

[100]

- [101] 실시예 7. 관절염 유도 모델에서 Dab2 과발현 준성숙 수지상세포백신 (CII-smDC-Dab2)의 조절 T 세포 유도 증가 확인

- [102] CIA 관절염 모델에서 Dab2 과발현 준성숙 수지상세포백신 (smDC-Dab2)의 조절 T 세포 활성 여부를 조사하기 위해 다음과 같은 실험을 진행하였다. 제2형 콜라겐을 처리한 Dab2-과발현 준성숙 수지상세포백신 (CII-smDC-Dab2) 및 Dab2 정상 준성숙 수지상세포백신 (CII-smDC)으로 치료를 진행한 CIA 관절염 유도 마우스로부터 비장을 적출하여 비장세포를 분리하였다. 비장세포로부터 조절 T 세포를 분석하기 위해, 형광이 표지된 항체를 사용하였다. 세포는 다음과 같은 표지항체들을 사용하여 4°C에서 20분 동안 FACS buffer에서 염색 되었다: FITC-labeled antimouse CD25(rmC53), PE-labeled antimouse/human Foxp3. 세포 세척 후, 세포는 FACS Calibur (BD) 와 CellQuest 또는 FlowJo software 프로그램을 사용하여 분석하였고, 그 결과를 도 9에 나타내었다. 도 9에 나타낸 바와 같이, CII-smDC-Dab2로 치료한 마우스에서 CII-smDC로 치료한 마우스보다 현저히 Treg의 개체수가 증가하였으며 이러한 증가는 통계적으로 유의하였다.

[103]

- [104] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

산업상 이용가능성

- [105] 본 발명에 따른 Dab2 유전자가 과발현 혹은 Dab2 단백질의 활성이 증가된

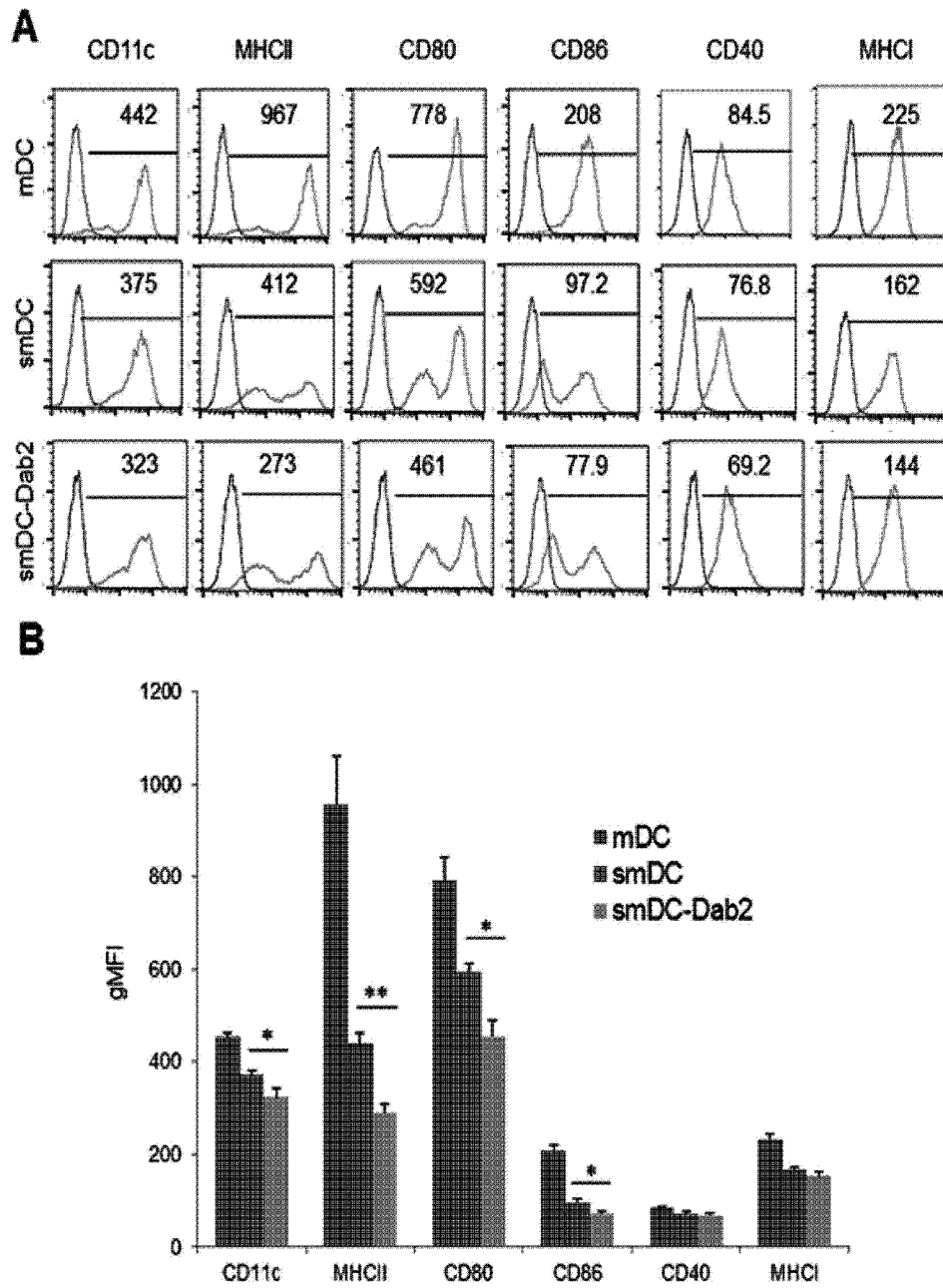
수지상 세포는 염증반응을 억제할 수 있는 조절 T 세포 및 항염증성 사이토카인 발현이 향상될 뿐만 아니라, 염증성 사이토카인 및 염증반응 관련 항원 특이적 T 세포 증식을 억제시킬 수 있는바, 관절염을 비롯한 자가면역질환의 예방, 개선 또는 치료하기 위한 약학적 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

청구범위

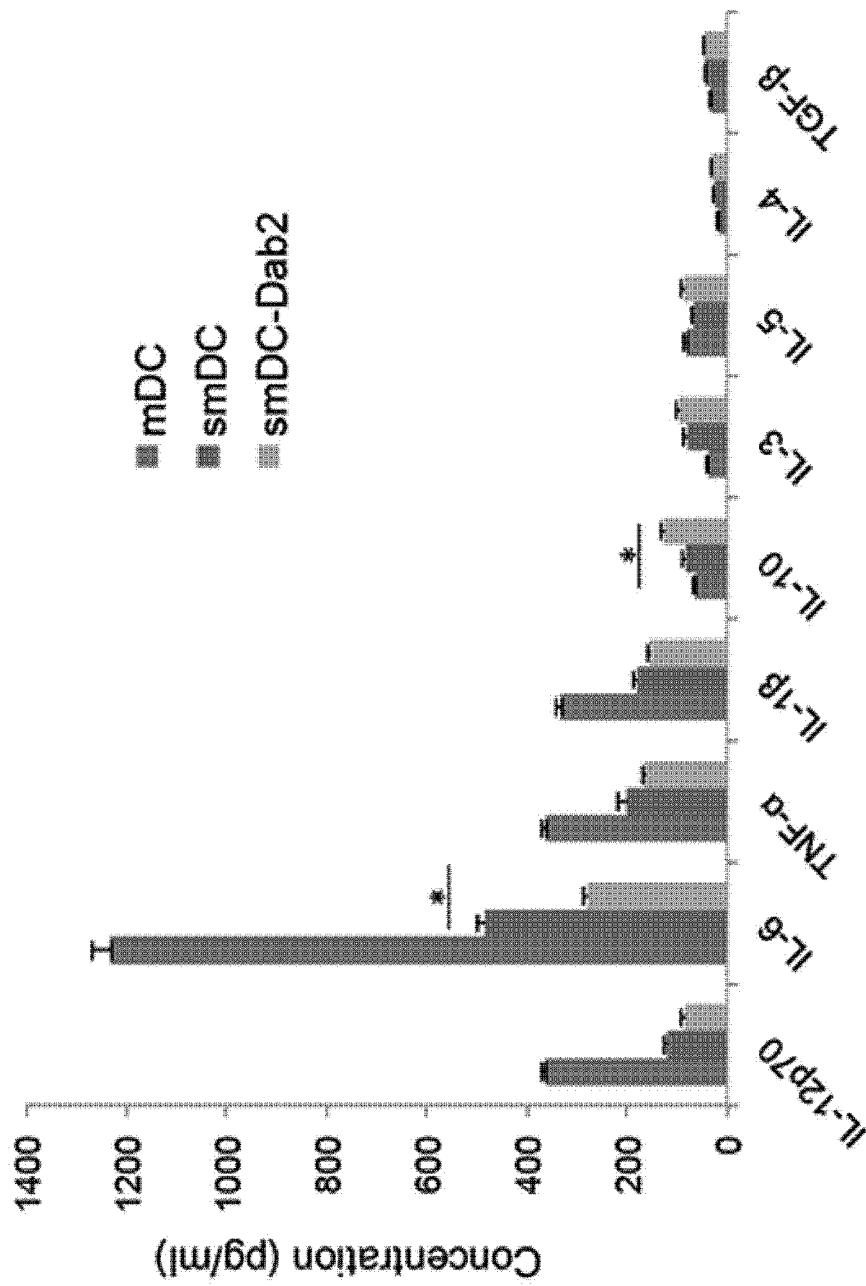
- [청구항 1] Dab2 유전자의 과발현 또는 Dab2 단백질의 활성이 증가된 수지상 세포를 유효성분으로 포함하는 자가면역질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 수지상 세포는 준성숙 수지상세포인 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 Dab2 유전자의 과발현은 상기 Dab2 유전자가 함유된 발현 벡터에 의해 이루어지는 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 Dab2 유전자의 과발현은 수지상 세포 내 Dab2의 과발현을 유도할 수 있는 사이토카인, 성장인자, 케모카인, 비타민 D, 항체 또는 신호전달 활성화 약물에 의해 이루어지는 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 Dab2 단백질의 활성 증가는 상기 Dab2 단백질에 상보적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 기질유사체 또는 앵타머에 의해 이루어지는 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 Dab2 단백질의 활성 증가는 Dab2 활성화억제인자 (antagonist)와 결합하는 화합물 펩티드, 펩티드 미메틱스, 기질유사체, 앵타머 또는 항체에 의해 이루어지는 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 Dab2 유전자가 과발현된 준성숙 수지상 세포에서는 MHCII, CD80, CD86 또는 CD40의 발현이 감소되는 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 8] 제1항에 있어서,
상기 조성물은 T 세포 증식을 억제하는 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 9] 제1항에 있어서,
상기 조성물은 항원 특이적 조절 T 세포를 증가시키는 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 10] 제1항에 있어서,
상기 자가면역질환은 류마티스 관절염, 염증성 대장염, 전신성 경피증, 홍반성 낭창, 아토피 피부염, 베체씨병, 쇼그렌 증후군,

- 다발성 경화증 및 그레이브씨 갑상선 항진증으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 11] Dab2 유전자의 과발현 또는 Dab2 단백질의 활성이 증가된 수지상 세포를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 자가면역질환 치료방법.
- [청구항 12] Dab2 유전자의 과발현 또는 Dab2 단백질의 활성이 증가된 수지상 세포의 자가면역질환 예방 또는 치료 용도.

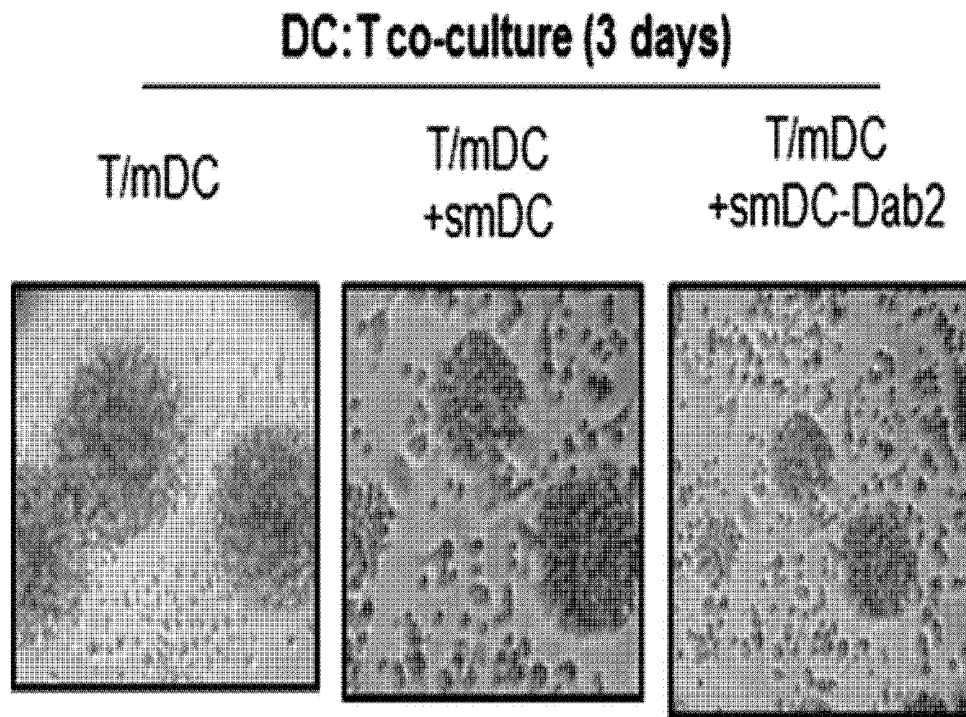
[도1]



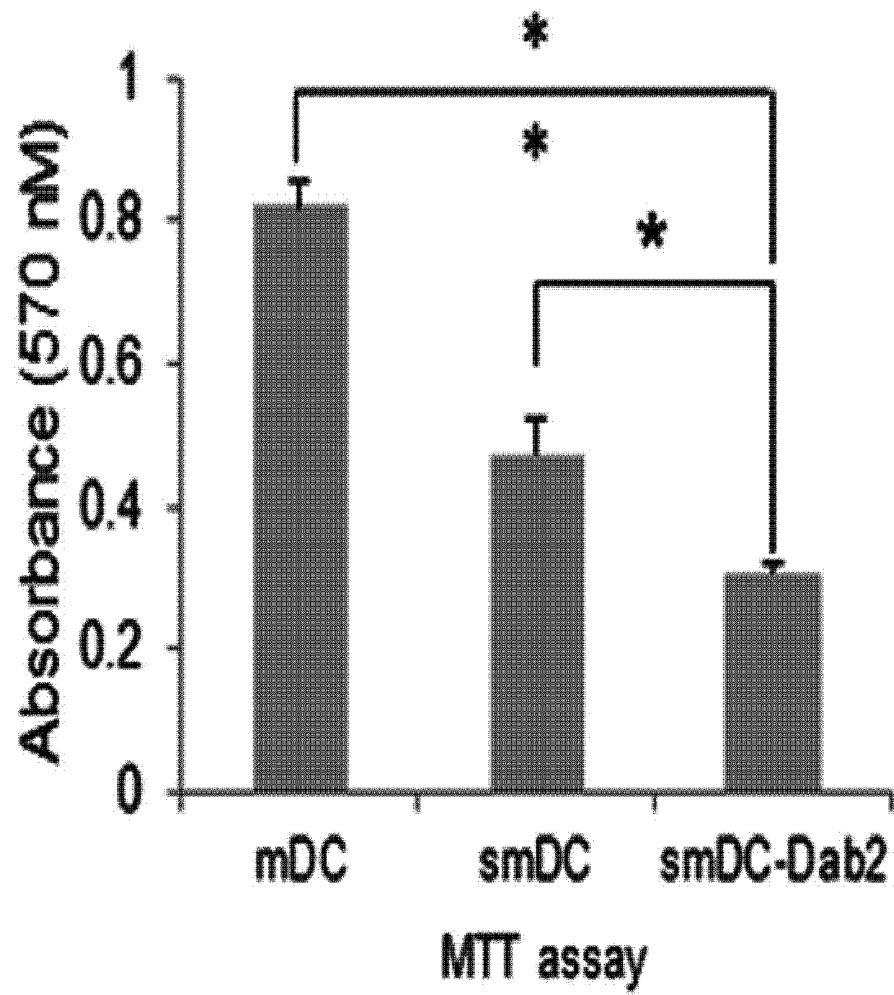
[도2]



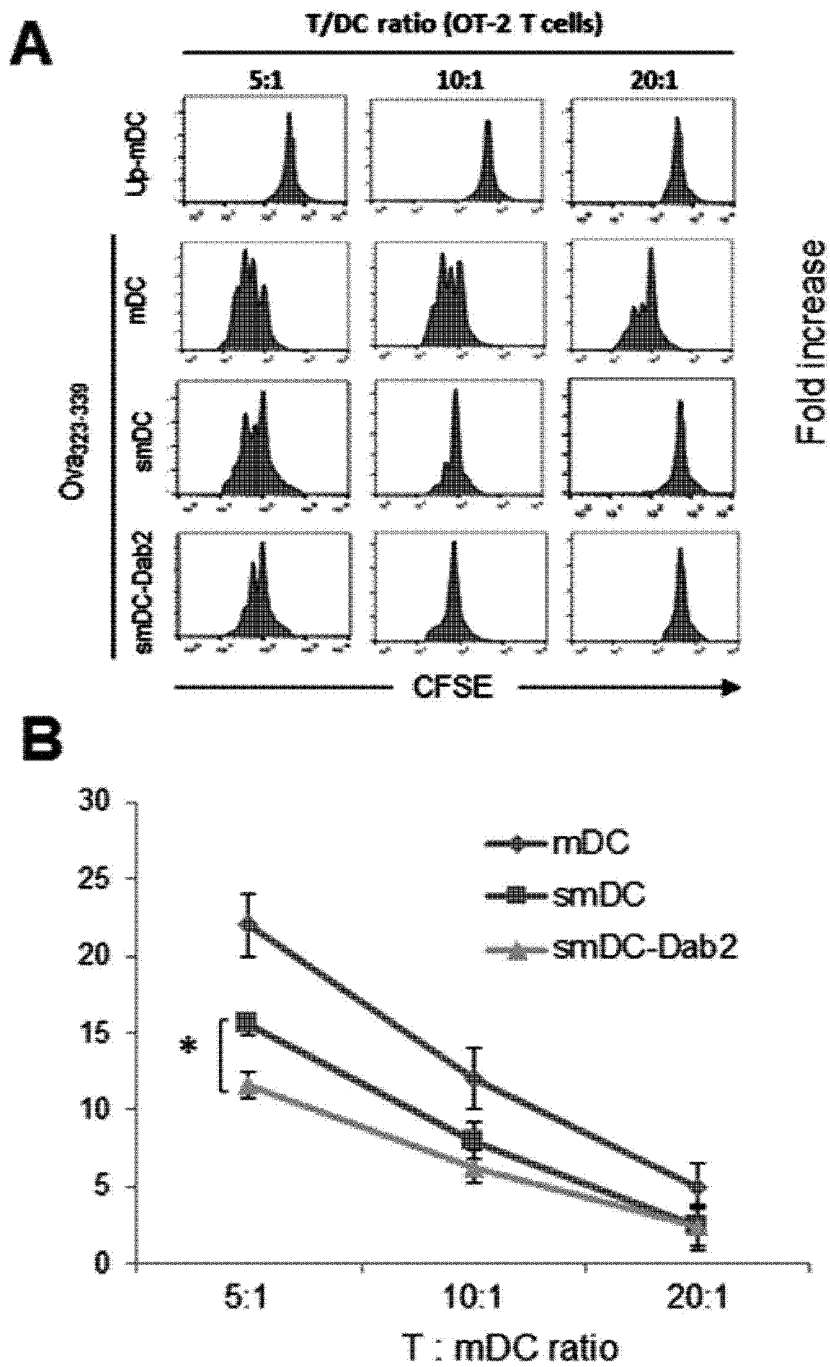
[도3]



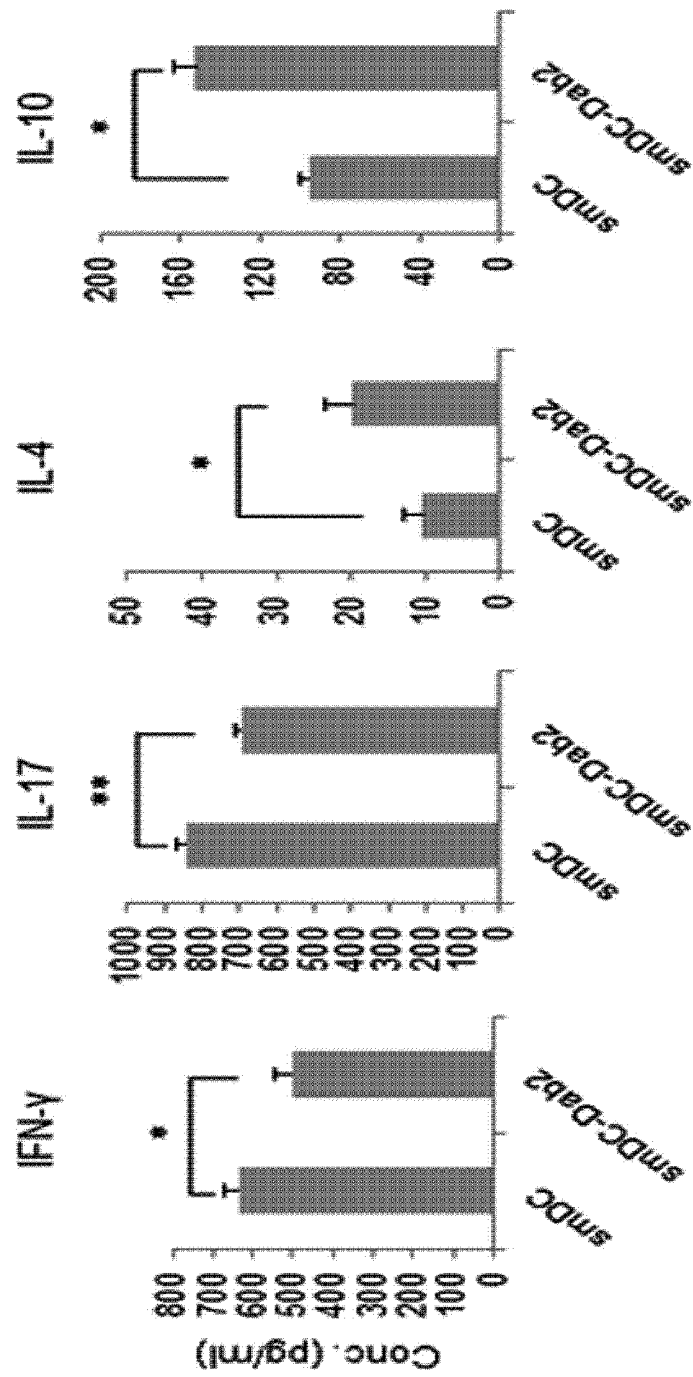
[도4]



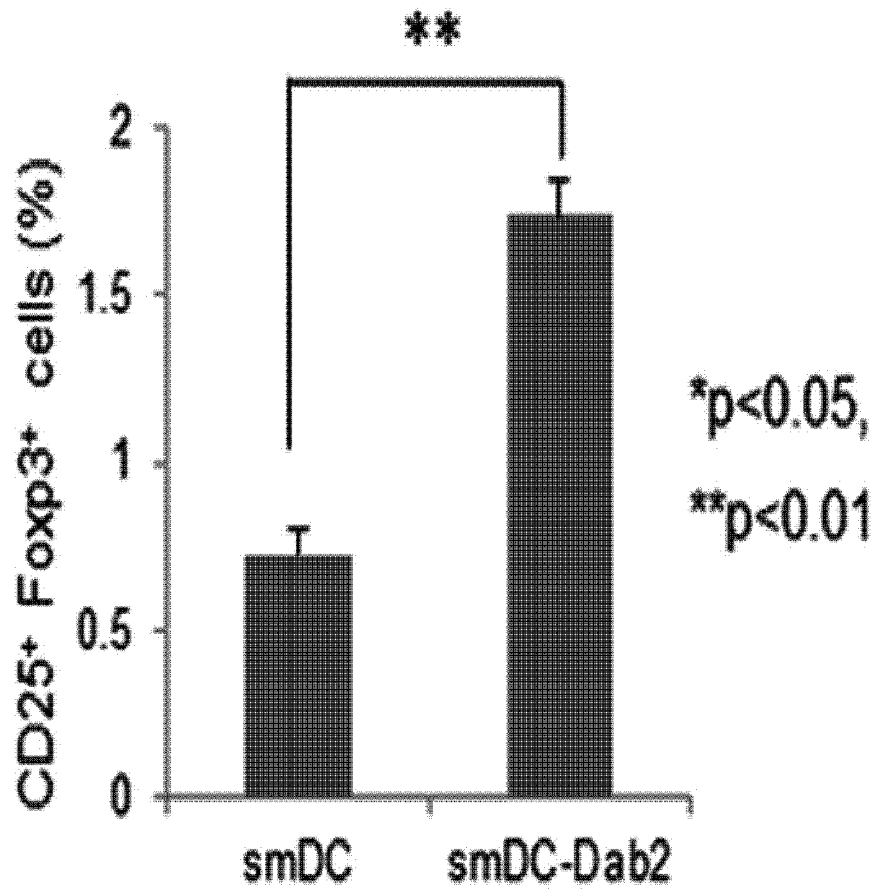
[도5]



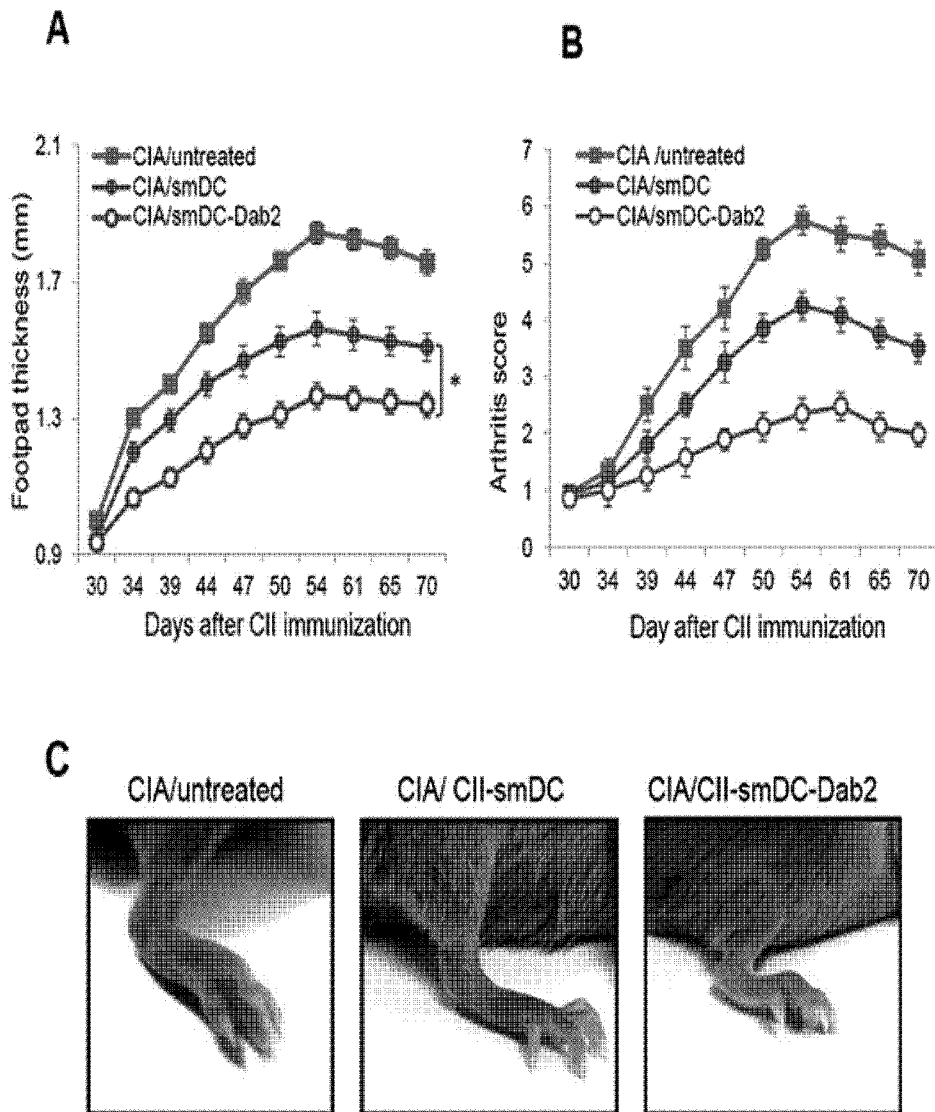
[도6]



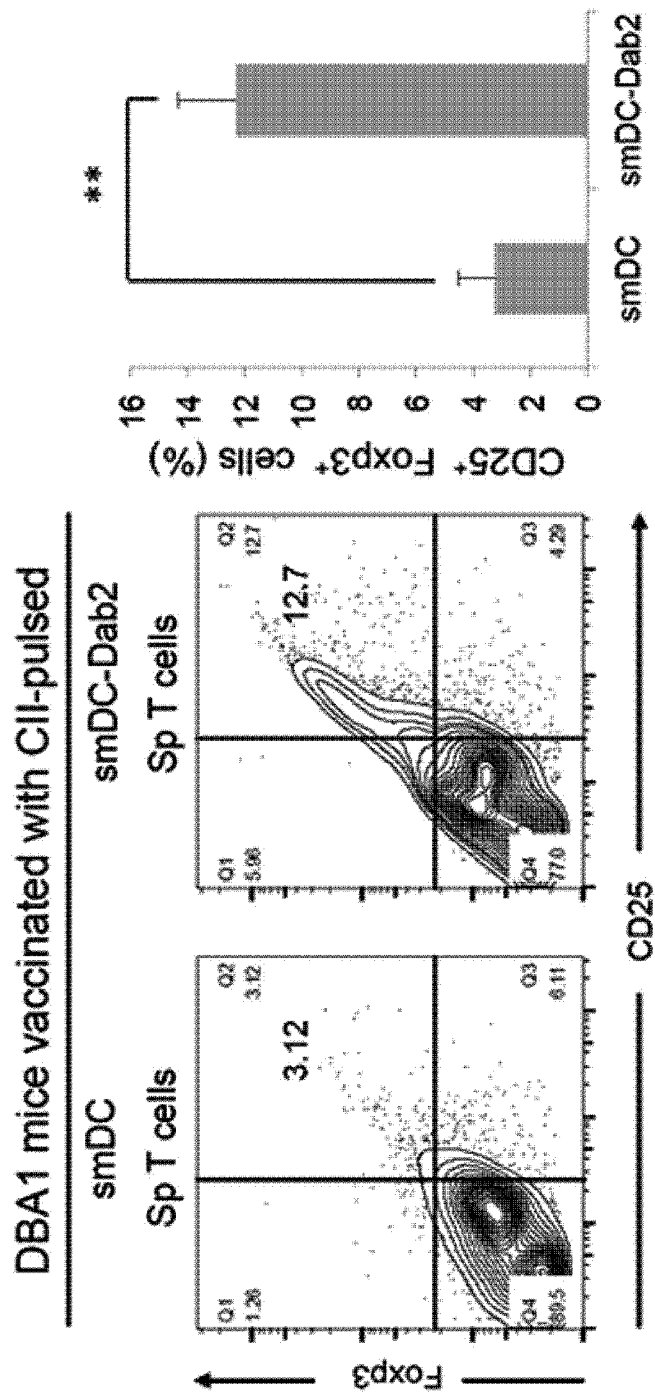
[도7]



[도8]



[도9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/004043**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****A61K 35/12(2006.01)i, A61K 39/395(2006.01)i, A61P 19/02(2006.01)i, A61P 29/00(2006.01)i***

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 35/12; A61P 19/02; C12N 5/0784; A61K 35/14; C12N 5/0775; A61K 39/395; A61P 29/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: Dab2, semimature dendritic cells (smDC), autoimmune disease

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MIAH, MOHAMMAD ALAM et al., "Egr2 induced during DC development acts as an intrinsic negative regulator of DC immunogenicity", European Journal of Immunology, 2013, vol. 43, no. 9, pages 2484-2496 See abstract; page 2485, right column, page 2489, right column, page 2491, left column; figure 6.	1-10,12
Y	JAIN, NITYA et al., "Cutting edge: Dab2 is a FOXP3 target gene required for regulatory T cell function", The Journal of Immunology, 2009, vol. 183, no. 7, pages 4192-4196 See abstract; page 4194, right column.	1-10,12
Y	KR 10-2008-0095343 A (CREAGENE INC.) 29 October 2008 See abstract; paragraph [0012]; claims 3, 5.	2,7
A	JOKUBAITIS, VILIJA G. et al., "Endogenously regulated Dab2 worsens inflammatory injury in experimental autoimmune encephalomyelitis", Acta Neuropathologica Communications, 2013, vol. 1, Thesis Number 32, pages 1-14 See abstract; page 9.	1-10,12
A	KR 10-2008-0078204 A (CREAGENE INC.) 27 August 2008 See abstract; claims 8-13.	1-10,12



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 JULY 2015 (30.07.2015)

Date of mailing of the international search report

31 JULY 2015 (31.07.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/004043

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **11**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 11 pertains to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, and thus pertains to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/004043

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	AHMEDA, MD. SELIM et al., "Dab2, a negative regulator of DC immunogenicity, is an attractive molecular target for DC-based immunotherapy", <i>Oncolimmunology</i> , January 2015, vol. 4, no. 1, pages e984550-1-e984550-15 See the entire document.	1-10,12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/004043

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2008-0095343 A	29/10/2008	US 2010-0215624 A1 WO 2008-130100 A1	26/08/2010 30/10/2008
KR 10-2008-0078204 A	27/08/2008	US 2010-0055076 A1 WO 2008-102937 A1	04/03/2010 28/08/2008

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 35/12(2006.01)i, A61K 39/395(2006.01)i, A61P 19/02(2006.01)i, A61P 29/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 35/12; A61P 19/02; C12N 5/0784; A61K 35/14; C12N 5/0775; A61K 39/395; A61P 29/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: Dab2, 준성숙 수지상세포, 자가면역질환

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	MIAH, MOHAMMAD ALAM 등, "Egr2 induced during DC development acts as an intrinsic negative regulator of DC immunogenicity", European Journal of Immunology, 2013, 제43권, 제9호, 페이지 2484-2496 요약; 페이지 2485, 오른쪽 컬럼, 페이지 2489, 오른쪽 컬럼, 페이지 2491, 왼쪽 컬럼; 도면 6 참조.	1-10, 12
Y	JAIN, NITYA 등, "Cutting edge: Dab2 is a FOXP3 target gene required for regulatory T cell function", The Journal of Immunology, 2009, 제183권, 제7호, 페이지 4192-4196 요약; 페이지 4194, 오른쪽 컬럼 참조.	1-10, 12
Y	KR 10-2008-0095343 A (크레아젠 주식회사) 2008.10.29 요약; 단락 [0012]; 청구항 3, 5 참조.	2, 7
A	JOKUBAITIS, VILIJA G. 등, "Endogenously regulated Dab2 worsens inflammatory injury in experimental autoimmune encephalomyelitis", Acta Neuropathologica Communications, 2013, 제1권, 논문번호 32, 내부페이지 1-14 요약; 페이지 9 참조.	1-10, 12
A	KR 10-2008-0078204 A (크레아젠 주식회사) 2008.08.27 요약; 청구항 8-13 참조.	1-10, 12

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2015년 07월 30일 (30.07.2015)

국제조사보고서 발송일

2015년 07월 31일 (31.07.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



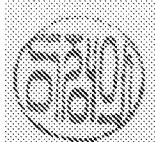
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

이정아

전화번호 +82-42-481-8740



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
PX	AHMEDA, MD. SELIM 등, "Dab2, a negative regulator of DC immunogenicity, is an attractive molecular target for DC-based immunotherapy", OncoImmunology, 2015.01., 제4권, 제1호, 페이지 e984550-1-e984550-15 전체 문헌 참조.	1-10,12

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 11
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 제11항은 수술 또는 치료에 의한 사람의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제 17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2008-0095343 A	2008/10/29	US 2010-0215624 A1 WO 2008-130100 A1	2010/08/26 2008/10/30
KR 10-2008-0078204 A	2008/08/27	US 2010-0055076 A1 WO 2008-102937 A1	2010/03/04 2008/08/28