



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0000042
(43) 공개일자 2025년01월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/47 (2006.01) A61K 35/17 (2015.01)
A61P 29/00 (2023.01) A61P 31/00 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)

(52) CPC특허분류

C07K 14/4705 (2013.01)
A61K 35/17 (2023.05)

(21) 출원번호 10-2023-0080718

(22) 출원일자 2023년06월23일

심사청구일자 2023년06월23일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

송규용

대전광역시 유성구 상대복용로29번길 51, 208동
3301호(상대동, 대전아이파크시티 2단지)

(74) 대리인

특허법인 공간

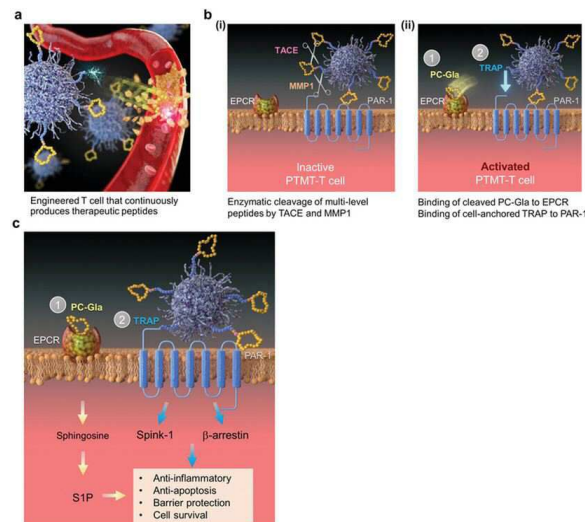
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 절단 반응성 펩타이드를 발현하는 키메라 T 세포 및 이를 포함하는 감염 질환 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 내피 단백질 C 수용체(endothelial protein C receptor, PC-Gla)의 리간드-효소 절단 부위(Cleavage site)-트롬빈 수용체 작용제 펩티드(thrombin receptor agonist peptide, TRAP)를 포함하는 융합폴리펩타이드 및/또는 상기 융합폴리펩타이드를 표면에 발현하는 형질전환 T 세포 및/또는 이를 포함하는 염증성 질환의 치료용 조성물에 관한 것으로, 면역 세포 표면에 다단계 치료 펩타이드 약물을 지속적으로 발현시킴으로써 반감기를 연장시키고 내피 단백질 C 수용체(EPCR) 및 프로테아제 활성화 수용체-1(PAR-1)을 동시에 활성화시킴으로써 혈관 손상을 예방하고 생체 내에서 과세포질혈증 및 조직 손상을 억제하여 패혈증 및 기타 감염 관련 염증성 질환의 예방 및 치료에 획기적으로 기여할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 29/00 (2023.02)

A61P 31/00 (2018.01)

C12N 5/0636 (2023.05)

C07K 2319/50 (2013.01)

C12N 2510/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

단백질 C 감마-카르복시글루탐산(γ -carboxyglutamic acid of protein C, PC-Gla) 도메인-효소 절단 부위(Cleavage site)-트롬빈 수용체 작용제 펩티드(thrombin receptor agonist peptide, TRAP)를 포함하는 융합폴리펩타이드.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 효소 절단 부위는 종양 괴사 인자 알파 전환 효소(tumor necrosis factor alpha converting enzyme, TACE) 또는 매트릭스 메탈로펩티다아제 1(matrix metalloproteinases 1, MMP1) 또는 이들의 혼합 효소에 의하여 절단되는 것을 특징으로 하는 융합폴리펩타이드.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 융합폴리펩타이드는 서열번호 9로 이루어진 것을 특징으로 하는 융합폴리펩타이드.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 융합폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 5

제4항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터.

청구항 6

제5항의 발현벡터로 형질전환된 형질전환체.

청구항 7

단백질 C 감마-카르복시글루탐산(γ -carboxyglutamic acid of protein C, PC-Gla) 도메인-효소 절단 부위(Cleavage site)-트롬빈 수용체 작용제 펩티드(thrombin receptor agonist peptide, TRAP)를 포함하는 융합폴리펩타이드를 표면에 발현하는 형질전환 T 세포.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 효소 절단 부위는 종양 괴사 인자 알파 전환 효소(tumor necrosis factor alpha converting enzyme, TACE) 또는 매트릭스 메탈로펩티다아제 1(matrix metalloproteinases 1, MMP1) 또는 이들의 혼합 효소에 의하여 절단되는 것을 특징으로 하는 형질전환 T 세포.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 융합폴리펩타이드는 서열번호 9로 이루어진 것을 특징으로 하는 형질전환 T 세포.

청구항 10

제7항 내지 제9항 중 어느 한 항의 형질전환 T 세포를 포함하는 염증성 질환의 치료용 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 염증성 질환은 상기 염증성 질환은 염증성 장 질환, 당뇨병 안질환, 복막염, 골수염, 봉소염, 뇌막염, 뇌염, 폐장염, 외상 유발 쇼크, 기관지 천식, 비염, 부비동염, 중이염, 폐렴, 위염, 장염, 낭포성 섬유증, 졸증, 기관지염, 세기관지염, 간염, 신장염, 관절염, 통풍, 척추염, 라이터 증후군, 결절성 다발동맥염, 과민성 혈관염, 루게닉 육아종증, 류마티스성 다발성근육통, 관절 세포 동맥염, 칼슘 결정 침착 관절병증, 가성 통풍, 비-관절 류마티즘, 점액낭염, 건초염, 상과염(테니스 엘보), 신경병증성 관절 질환, 출혈성관절증, 헤노흐-헨라인 자반병, 비후성 골관절병증, 다중심성 세망조직구종, 수르코일로시스, 혈색소증, 겸상 적혈구증, 고지단백혈증, 저감마글로불린혈증, 부갑상선기능항진증, 말단거대증, 가족성 지중해열, 베하트 병, 전신성 홍반성 루푸스, 재귀열, 건선, 다발성 경화증, 패혈증, 패혈성 쇼크, 급성 호흡곤란 증후군, 다발성 장기부전, 만성 폐쇄성 폐질환, 급성 폐손상 및 기관지 폐 형성장애으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나인 것을 특징으로 하는 염증성 질환의 치료용 조성물.

청구항 12

제7항 내지 제9항 중 어느 한 항의 형질전환 T 세포를 포함하는 감염 질환의 치료용 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 감염 질환은 사스-코로나바이러스-2(SARS-CoV-2) 감염에 의한 패혈증, 패혈성 쇼크, 고사이토카인혈증, 급성 호흡곤란 증후군, 급성 폐손상, 기관지 폐 형성 장애, 다발성 장기부전 및 만성 폐쇄성 폐질환으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나인 것을 특징으로 하는 감염 질환의 치료용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 절단 반응성 펩타이드를 발현하는 키메라 T 세포 및 이를 포함하는 감염 질환 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 2019년 말 COVID-19의 출현 이후 제약회사와 연구자들은 지속적으로 신종 감염병 치료제 개발에 매진해 왔다. 그러나 백신 접종 후에도 돌발 감염으로 인해 전염병 관련 숫자가 계속 증가하고 있으며, 특히 집중 치료법의 발전에도 불구하고, 중증으로 진행된 전염병에 대한 치료 전략이나 효과적인 예방 조치는 아직 없는 실정이다.

[0003] 중증 COVID19와 같은 감염 관련 질환 중 패혈증은 급성 미생물 감염에 의해 발생하는 전신 염증성 증후군으로 사이토카인 폭풍(cytokine storm)의 위험에 직면하게 된다. 사이토카인 폭풍 또는 사이토카인 방출 증후군(cytokine release syndrome, CRS)은 환자의 면역체계가 과활성화되면서 염증성 사이토카인과 엔도톡신이 누출되어 중환자실 사망의 주요 원인 중 하나가 되고 있다. 그러나 현재까지 패혈증을 치료할 수 있는 치료법이 없으며, 감염병의 치료 후에도 환자는 조직 손상에서 완전히 회복되지 않을 수 있고 더 나아가 다발성 장기 부전 및 사망으로 더 진행될 수 있다. 이에 패혈증과 CRS에 대한 효과적인 대체 치료 전략의 개발이 시급히 요구되고 있다.

[0004] 한편, 생물학적 활성을 갖는 펩티드 기반 치료제는 1920년대 인슐린 요법의 출현 이래 오랜 기간 인간의 건강에 기여해 왔다. 현재 승인된 60개 이상의 펩티드 기반 치료제가 있으며 150개 이상의 펩티드가 현재 임상 개발에 들어가기를 기다리며 활발히 개발 중이고 그 수는 계속 증가하고 있다. 그러나 혈액 순환하는 치료용 펩타이드는 효소 소화에 취약하여 안정성과 활성이 쉽게 손실되는 문제가 있다. Shahnaz 등(2012)은 펩티드 기반 치료제가 면역 세포의 신호 조절 및 혈관 무결성 보호에 효과를 나타내나 혈액 순환에서 펩티드의 짧은 반감기로 인해 생체 내 적용이 제한되는 점을 보고하였다.

[0005] 항응고제, 항염증제 및 섬유소 용해 특성을 가져 중증 패혈증 치료제로 알려진 재조합 활성 단백질 C(APC, 상표명 Xigris, Eli Lilly) 또한 전혈에서는 15~18분, 구연산 처리 혈액에서 약 30분의 매우 짧은 반감기를 가진다.

이와 같이, APC가 혈액에서 빠르게 제거되기 때문에(Matthay, 2001) 일정 용량을 달성하기 위해서는 자주 투여해야 하는 문제가 있었으며, Xigris는 중증 패혈증 및 패혈성 쇼크 환자의 생존 이점을 보여주지 못하고 결국 2011년 시장에서 철수하였다. 현재 중증 전염병 환자를 치료하는 데 사용할 수 있는 FDA 승인 치료 펩티드는 없으며, 생체 조직 내에서 치료용 펩타이드를 안정적으로 발현하고 체계적으로 방출함으로써 패혈증 환자의 생존율을 증가시킬 수 있는 새로운 전략이 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006]

(특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2008-0021682호, 패혈증 치료용 재조합 활성화 인간 단백질 C의 제조를 위한 코돈 최적화를 포함하는 방법, 2008년03월07일. 공개.

(특허문헌 0002) 한국등록특허 제10-1284884호, 정상의 세포보호 활성 및 저하된 항응고 활성을 지닌활성화 단백질 C 변이체, 2013년07월04일. 등록.

(특허문헌 0003) 한국등록특허 제10-1856210호, 활성 및 비활성 단백질 C에 대한 모노클로날 항체, 2018년05월02일. 등록.

(특허문헌 0004) 한국공개특허 제10-2001-0053345호, 단백질 C 유도체, 2001년06월25일. 공개.

비특허문헌

[0007]

Ü(비특허문헌 0001) Gul Shahnaz, Javed Iqbal, Deni Rahmat, Glen Perera, Flavia Laffleur, Denise Rossi, Andreas Bernkop-Schnrch, Development and in vivo characterization of a novel peptide drug delivery system providing extended plasma half life, Journal of Controlled Release Volume 157, Issue 3, 10 February 2012, Pages 375-382

(비특허문헌 0002) Michael A. Matthay, Severe Sepsis - A New Treatment with Both Anticoagulant and Antiinflammatory Properties, N Engl J Med 2001; 344:759-762

(비특허문헌 0003) William C. Aird, Laurent O. Mosnier, Rick M. Fairhurst, Plasmodium falciparum picks (on) EPCR, BLOOD, Volume 123, Issue 2, 9 January 2014, Pages 163-167

(비특허문헌 0004) Clemens Feistritz, Reto A. Schuepbach, Laurent O. Mosnier, Leslie A. Bush, Enrico Di Cera, John H. Griffin, Matthias Riewald, Protective Signaling by Activated Protein C Is Mechanistically Linked to Protein C Activation on Endothelial Cells, Journal of Biological Chemistry, Volume 281, Issue 29, 21 July 2006, Pages 20077-20084

(비특허문헌 0005) Jong-Sup Bae, Likui Yang, Chandrashekhara Manithody, Alireza R. Rezaie, The ligand occupancy of endothelial protein C receptor switches the protease-activated receptor 1-dependent signaling specificity of thrombin from a permeability-enhancing to a barrier-protective response in endothelial cells, Blood, Volume 110, Issue 12, 1 December 2007, Pages 3909-3916

(비특허문헌 0006) Jeong Ah Kim, Hong Nam Kim, Sun-Kyoung Im, Seok Chung, Ji Yoon Kang, and Nakwon Choi, Collagen-based brain microvasculature model in vitro using three-dimensional printed template, Biomicrofluidics 9, 024115 (2015)

(비특허문헌 0007) Jingjing Xu, Peng Zhou, Wenjuan Wang, Aining Sun and Feng Guo, RelB, together with RelA, sustains cell survival and confers proteasome inhibitor sensitivity of chronic lymphocytic leukemia cells from bone marrow, Journal of Molecular Medicine volume 92, pages77-92 (2014)

(비특허문헌 0008) Daniel Rittirsch, Markus S Huber-Lang, Michael A Flierl and Peter A Ward, Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture, Nature Protocols volume 4, pages31-36 (2009)

laé(비특허문헌 0009) Anthony Kusnadi, Ciro Ramirez-Sustegui, Vicente Fajardo, Serena J. Chee, Benjamin

J. Meckiff, Hayley Simon, Emanuela Pelosi, Grgory Seumoio, Ferhat Ay, Pandurangan Vijayanand, Christian H. Ottensmeier, Severely ill patients with COVID-19 display impaired exhaustion features in SARS-CoV-2-reactive CD8+ T cells, Sci. Immunol.6, eabe4782 (2021)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 단백질 C 감마-카르복시글루탐산(γ -carboxyglutamic acid of protein C, PC-Gla) 도메인-효소 절단 부위(Cleavage site)-트롬빈 수용체 작용제 펩티드(thrombin receptor agonist peptide, TRAP)를 포함하는 융합폴리펩타이드를 제공하는 데 있다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 단백질 C 감마-카르복시글루탐산(γ -carboxyglutamic acid of protein C, PC-Gla) 도메인-효소 절단 부위(Cleavage site)-트롬빈 수용체 작용제 펩티드(thrombin receptor agonist peptide, TRAP)를 포함하는 융합폴리펩타이드를 표면에 발현하는 형질전환 T 세포를 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 과제를 해결하기 위하여 본 발명은 단백질 C 감마-카르복시글루탐산(γ -carboxyglutamic acid of protein C, PC-Gla) 도메인-효소 절단 부위(Cleavage site)-트롬빈 수용체 작용제 펩티드(thrombin receptor agonist peptide, TRAP)를 포함하는 융합폴리펩타이드를 제공한다.

[0011] 상기 단백질 C 감마-카르복시글루탐산(γ -carboxyglutamic acid of protein C, PC-Gla) 도메인은 내피 단백질 C 수용체(endothelial protein C receptor, EPCR)의 리간드로 작용하여 EPCR을 활성화할 수 있다.

[0012] 상기 효소 절단 부위는 종양 괴사 인자 알파 전환 효소(tumor necrosis factor alpha converting enzyme, TACE) 또는 매트릭스 메탈로펩티다아제 1(matrix metalloproteinases 1, MMP1) 또는 이들의 혼합 효소에 의하여 절단될 수 있으며, 상기 절단에 의하여 단백질 C 감마-카르복시글루탐산(γ -carboxyglutamic acid of protein C, PC-Gla) 도메인은 분리되어 EPCR의 리간드로 작용하여 활성화시키고, TRAP은 프로테아제 활성화 수용체-1(protease-activated receptor-1, PAR-1)을 활성화시킬 수 있다.

[0013] 상기 융합폴리펩타이드는 서열번호 9의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 한다.

[0014] 본 발명은 단백질 C 감마-카르복시글루탐산(γ -carboxyglutamic acid of protein C, PC-Gla) 도메인-효소 절단 부위(Cleavage site)-트롬빈 수용체 작용제 펩티드(thrombin receptor agonist peptide, TRAP)를 포함하는 융합폴리펩타이드 또는 9의 아미노산 서열로 이루어진 융합폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0015] 또한 본 발명은 상기 융합폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터 및 상기 발현벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.

[0016] 본 발명의 발현벡터는 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 하며, 그 종류는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파지 벡터 및 바이러스 벡터 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 발현벡터는 통상의 발현벡터일 수 있으며, 발현벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서(촉진유전자) 같은 발현 조절 서열 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 상기 발현벡터의 프로모터는 구성적(constitutive) 또는 유도성(inducible)일 수 있다. 또한 상기 벡터는 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택 마커를 포함하고, 복제 가능한 벡터인 경우 복제기원을 포함한다.

[0017] 본 발명의 형질전환체는 본 발명의 발현벡터로 형질전환된 것을 특징으로 한다. 상기 발현벡터로 형질전환하는 것은 당업자에게 공지된 형질전환기술에 의해 수행될 수 있다. 바람직하게는 미세사출법(microprojectile bombardment), 전기충격유전자전달법(electroporation), 인산 칼슘(CaPO_4) 침전, 염화칼슘(CaCl_2) 침전, PEG매개 융합법(PEG-mediated fusion), 미세주입법(microinjection) 및 리포솜 매개법(liposome-mediated method)을 이용할 수 있으며, 상기 형질전환체는 대장균(*Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*), 스태필로코쿠스(*Staphylococcus*), 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)일 수 있으나, 이로 제

한되는 것은 아니다.

- [0018] 본 발명은 단백질 C 감마-카르복시글루탐산(γ -carboxyglutamic acid of protein C, PC-Gla) 도메인-효소 절단 부위(Cleavage site)-트롬빈 수용체 작용제 펩티드(thrombin receptor agonist peptide, TRAP)를 포함하는 융합폴리펩타이드를 표면에 발현하는 형질전환 T 세포를 제공한다.
- [0019] 상기 단백질 C 감마-카르복시글루탐산(γ -carboxyglutamic acid of protein C, PC-Gla) 도메인은 내피 단백질 C 수용체(endothelial protein C receptor, EPCR)의 리간드로 작용하여 EPCR을 활성화할 수 있다.
- [0020] 상기 효소 절단 부위는 종양 괴사 인자 알파 전환 효소(tumor necrosis factor alpha converting enzyme, TACE) 또는 매트릭스 메탈로펩티다아제 1(matrix metalloproteinases 1, MMP1) 또는 이들의 혼합 효소에 의하여 절단될 수 있으며, 상기 절단에 의하여 단백질 C 감마-카르복시글루탐산(γ -carboxyglutamic acid of protein C, PC-Gla) 도메인은 분리되어 EPCR의 리간드로 작용하여 활성화시키고, TRAP은 프로테아제 활성화 수용체-1(protease-activated receptor-1, PAR-1)을 활성화시킬 수 있다.
- [0021] 상기 융합폴리펩타이드는 서열번호 9의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 한다.
- [0022] 본 발명은 상기 형질전환 T 세포를 포함하는 염증성 질환의 치료용 조성물을 제공한다.
- [0023] 본 발명의 조성물은 인간을 비롯한 포유동물에 어떠한 방법으로도 투여할 수 있다. 바람직하게는 비경구적으로 투여할 수 있다. 비경구적인 투여방법으로는 이에 한정되지는 않으나, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장내 투여일 수 있다.
- [0024] 본 발명의 조성물은 비경구 투여용 제제의 경우에는 주사제 등의 형태로 당업계에 공지된 방법으로 제형화할 수 있다. 이들 제형은 모든 제약 화학에 일반적으로 공지된 처방서인 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995)에 기재되어 있다.
- [0025] 본 발명의 조성물의 총 유효량은 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있다. 바람직하게 본 발명의 약학적 조성물의 바람직한 전체 용량은 1일당 환자 체중 1kg 당 약 $0.01\mu\text{g}$ 내지 10,000mg, 가장 바람직하게는 $0.1\mu\text{g}$ 내지 500mg(TFG 100nM = $134.33\mu\text{g/kg}$, TFMG 100nM = $137.015\mu\text{g/kg}$)일 수 있다. 그러나 상기 약학적 조성물의 용량은 제제화 방법, 투여 경로 및 치료 횟수뿐만 아니라 환자의 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 질환의 중증도, 식이 및 배설율 등 다양한 요인들을 고려하여 환자에 대한 유효 투여량이 결정되는 것이므로, 이러한 점을 고려할 때 당 분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 본 발명의 조성물의 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 본 발명의 효과를 보이는 한 그 제형, 투여 경로 및 투여 방법에 특별히 제한되지 아니한다.
- [0026] 본 발명에서 상기 염증성 질환은 염증성 장 질환, 당뇨병 안질환, 복막염, 골수염, 봉소염, 뇌막염, 뇌염, 척장염, 외상 유발 쇼크, 기관지 천식, 비염, 부비동염, 중이염, 폐렴, 위염, 장염, 낭포성 섬유증, 줄종, 기관지염, 세기관지염, 간염, 신장염, 관절염, 통풍, 척추염, 라이트 증후군, 결절성 다발동맥염, 과민성 혈관염, 루게릭 육아종증, 류마티스성 다발성근육통, 관절 세포 동맥염, 갈습 결정 침착 관절병증, 가성 통풍, 비-관절 류마티즘, 점액낭염, 건초염, 상과염(테니스 엘보), 신경병증성 관절 질환(Charcot's joint), 출혈성관절증(hemarthrosis), 헤노흐-셴라인 자반병, 비후성 골관절병증, 다중심성 세망조직구종, 수르코일로시스(surcoilosis), 혈액소증, 겸상 적혈구증, 고지단백혈증, 저감마글로불린혈증, 부갑상선기능항진증, 말단거대증, 가족성 지중해열, 베하트병, 전신성 홍반성 루푸스, 재귀열, 건선, 다발성 경화증, 패혈증, 패혈성 쇼크, 급성 호흡곤란 증후군, 다발성 장기부전, 만성 폐쇄성 폐질환(chronic obstructive pulmonary disease), 급성 폐손상(acute lung injury) 및 기관지 폐 형성장애(broncho-pulmonary dysplasia)로 이루어진 군에서 선택된 하나일 수 있다.
- [0027] 본 발명에서 상기 염증성 질환은 박테리아 또는 바이러스 감염에 의한 것일 수 있다.
- [0028] 본 발명은 상기 형질전환 T 세포를 포함하는 감염 질환의 치료용 조성물을 제공한다.
- [0029] 상기 감염 질환은 사스-코로나바이러스-2(SARS-CoV-2) 감염에 의한 패혈증, 패혈성 쇼크, 고사이토카인혈증, 급성 호흡곤란 증후군, 급성 폐손상, 기관지 폐 형성 장애, 다발성 장기부전 및 만성 폐쇄성 폐질환으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나일 수 있다.

발명의 효과

[0030] 본 발명은 내피 단백질 C 수용체(endothelial protein C receptor, PC-Gla)의 리간드-효소 절단 부위(Cleavage site)-트롬빈 수용체 작용제 펩티드(thrombin receptor agonist peptide, TRAP)를 포함하는 융합폴리펩타이드 및/또는 상기 융합폴리펩타이드를 표면에 발현하는 형질전환 T 세포 및/또는 이를 포함하는 염증성 질환 또는 감염에 의한 염증성 질환 또는 감염 질환의 치료용 조성물에 관한 것으로, 면역 세포 표면에 다단계 치료 펩타이드 약물을 지속적으로 발현시킴으로써 반감기를 연장시키고 내피 단백질 C 수용체(EPCR) 및 프로테아제 활성화 수용체-1(PAR-1)을 동시에 활성화시킴으로써 혈관 손상을 예방하고 생체 내에서 과세포질혈증 및 조직 손상을 억제하여 패혈증 및 기타 감염 관련 염증성 질환의 예방 및 치료에 획기적으로 기여할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 본 발명에 따른 치료 펩타이드-발현 T 세포가 혈관 및 조직 염증에 나타내는 효과를 도식화한 것이다. a. 본 발명에 따른 치료 펩타이드-발현 T 세포가 혈관 및 조직 염증에 나타내는 효과 b. (i) TACE 및 MMP1에 의한 펩티드의 다단계 효소 절단 (ii) 절단된 PC-Gla의 EPCR에 대한 결합 세포 고정 TRAP의 PAR-1에 대한 결합 c. PC-Gla와 TRAP는 각각 EPCR과 PAR-1에 결합하여 치료 효과를 유도

도 2는 본 발명에 따른 PTMT-T 세포의 디자인 및 절단 반응성 펩티드를 확인한 결과이다. a. 대조군 T 세포 및 PTMT-T 세포의 벡터 디자인 b. MOI에 따른 PTMT-T 세포의 형질도입 효율 c. 체외 배양 시간에 따른 PTMT-T 세포-분비 PC-Gla의 웨스턴 블롯 분석 결과 d. 인간 CD8⁺에서 발현된 PC-Gla의 면역형광 이미지, PTMT-T 세포. 눈금 막대, 75 μm e. Naive 및 PTMT CD8⁺ T 세포의 주사 전자 현미경 이미지. 눈금 막대, 1 μm

도 3은 본 발명에 따른 PTMT-T 세포에서 PC-Gla 절단을 확인한 결과이다. a. 패혈성 쇼크 또는 중증 COVID-19 환자의 혈장에 노출되었을 때 PTMT-T 세포에서 발현되는 MMP1, TACE 및 PC-Gla의 웨스턴 블롯 분석(n = 3/각 그룹) b. 감염병 환자의 혈장에 노출 시 PTMT-T 세포에서 발현되는 gPC-Gla의 고성능액체크로마토그래피(HPLC) 분석 c. 감염병 환자의 혈장에 노출 시 PTMT-T 세포에서 발현되는 PC-Gla의 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) 분석, 데이터는 평균 ± SEM으로 표시, * p < 0.05, ** p < 0.01

도 4는 본 발명에 따른 PTMT-T 세포의 감염된 혈관의 내피 단백질 C 수용체(EPCR) 보호작용을 나타낸 결과이다. a. COVID-19 감염병의 중증도에 따른 가용성 EPCR(sEPCR)의 발현 수준. (정상 [n = 20], 경미한 COVID-19 [n = 70], 중증 COVID-19 [n = 30]) b. 생존 및 사망 환자의 sEPCR 발현 수준 c. COVID-19 환자 폐 조직의 컴퓨터 단층 촬영 이미지(n = 5) d. PTMT-T-세포와 공동 배양 시 중증 COVID-19 환자의 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 및 인간 제대 정맥 내피 세포(HUVEC)에서 EPCR 및 PAR-1의 웨스턴 블롯 분석 e. PTMT-T 세포와 공동 배양할 때 중증 COVID-19 환자의 PBMC에 의해 절단되는 sEPCR의 농도 f. PTMT-T 세포와 공동 배양할 때 HUVEC에 의해 절단되는 sEPCR의 농도 g. PAR-1 절단 활성화(** p < 0.01)

도 5는 Organ-on-a-chip 플랫폼에서 형성된 조작된 혈관에서 본 발명에 따른 PTMT-T 세포의 혈관 보호 효과를 나타낸 결과이다. a. Organ-on-a-chip 플랫폼 조작된 혈관 및 중증 COVID-19 환자의 혈장에 의해 손상된 혈관에서 PBS, Naive T 세포 및 PTMT-T 세포의 혈관 보호 효과. 눈금 막대, 200 μm b. 경내피 투과성의 정량화(n = 6/각 그룹, * p < 0.05). 반복 실험으로 최소 3회 수행됨. 데이터는 평균 ± SEM으로 표시됨. * p < 0.05, ** p < 0.01 PBS(n = 6) 및 네이티브 및 PTMT-T 세포(n = 4).

도 6은 PBS 및 본 발명에 따른 PTMT-T 세포를 중증 COVID-19 환자의 PBMC와 공동 배양 시, 중증 COVID-19 환자의 PBMC의 사이토카인 어레이 결과이다(n = 3).

도 7은 PBS 및 본 발명에 따른 PTMT-T 세포를 중증 COVID-19 환자의 PBMC와 공동 배양 시 방출된 사이토카인의 ELISA 결과이다. (n = 10/각 그룹, ** p < 0.01)이다. a. NF-κB 활성화 b. 인터루킨(IL)-1β c. IL-4, d. IL-6, e. IL-8, f. 인터페론(IFN)-γ 및 g. 종양 괴사 인자(TNF)-α의 발현 수준

도 8은 PBS 및 본 발명에 따른 PTMT-T 세포를 LPS 처리된 HUVEC와 공동 배양 시 방출된 사이토카인의 ELISA 결과이다. (n = 10/각 그룹, ** p < 0.01)이다. a. NF-κB 활성화 b. 인터루킨(IL)-1β c. IL-4, d. IL-6, e. IL-8, f. 인터페론(IFN)-γ 및 g. 종양 괴사 인자(TNF)-α의 발현 수준

도 9는 본 발명에 따른 PTMT-T 세포의 패혈증 마우스 모델에서 사이토카인 폭풍 및 폐 조직 손상 억제 효과를 나타내는 결과이다. a. CLP-수술 후 PTMT-T 세포의 정맥 주사 후 생존율 b. CLP 마우스 폐 조직의 헤마톡실린 및 에오신(H&E) 염색 c. 패혈증 마우스의 혈관 투과성 d. 폐 세포간 부착 분자(ICAM)-1의 발현 수준 e. 기관지

폐포 세척액(BAL)에서 호중구 이동 f. BAL에서 백혈구 이동 g. sEPCR의 농도 h. C 반응성 단백질(CRP) i. 젖산 탈수소효소(LDH) j. 알라닌 아미노전이효소(ALT) k. 아스파르테이트 아미노전이효소(AST) l. 혈액요소질소(BUN) (n = 5/각 그룹, ** p < 0.01). 반복 실험으로 최소 3회 수행됨, 데이터는 평균 ± SEM으로 표시됨. * p < 0.05, ** p < 0.01.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0032] 많은 연구자들은 APC의 효능이 낮은 이유를 중증 염증상태에서 방출된 사이토카인에 의해 내피 단백질 C 수용체(Endothelial Protein C Receptor, EPCR) 및 프로테아제 활성화 수용체-1(Protease-activated receptor-1, PAR-1)과 같은 수용체의 절단 때문인 것으로 설명하고 있다. APC의 세포 보호 효과는 APC와 EPCR의 γ -카르복시글루탐산(Gla) 도메인 사이의 상호작용과 PAR-1의 활성화로 개시되며, 이는 항염증 및 장벽 보호와 같은 세포 보호 신호 반응을 유도 한다(Matthay, 2001; Aird et al., 2014).
- [0033] 그런데 트롬빈(thrombin)은 APC보다 PAR-1을 절단하는 촉매 효율이 적어도 세 배 이상 높다고 보고되었고(Feistritz et al., 2006), 트롬빈 수용체 작용제 펩티드(TRAP)는 인간 내피 세포에서 트롬빈의 효과를 모방하여 PAR-1을 활성화한다. 또한, 배 등(2007)은 내피 세포에서 단백질 C(Protein C)가 EPCR에 결합하면서 PAR-1을 모집하고 트롬빈 또는 TRAP 스위치에 의해 PAR-1 의존적 신호전달을 개시함으로써 전 염증 상태에서 세포 보호 반응으로 전환한다고 보고하였다. 따라서 본 발명자는 EPCR과 PAR-1 모두를 동시에 점유하기 위해 안정적으로 발현하는 특정 펩타이드가 합병증없이 과사이토카인혈증을 억제할 수 있다는 가설을 세우고 본 발명을 안출하였다.
- [0034] 즉, 표면에 PC-Gla-TACE-MMP-TRAP(PMTT) 펩타이드를 발현하도록 조작된 T 세포(PMTT-T 세포)를 이용하여 치료 펩타이드를 전신 방출함으로써 중증 감염질환을 치료할 수 있는지 여부를 확인하였다. 이때, PMTT-T 세포가 감염병 환자의 혈장에 노출되었을 때 표면 발현 PC-Gla-TACE-MMP-TRAP(PMTT) 펩타이드가 PC-Gla와 TRAP으로 절단되어 염증 상태에서 EPCR 발산을 보호하고 CLP 유발 패혈증 마우스 모델에서 생존율을 향상시킨다는 것을 확인하였다. 이에 따라 본 발명의 치료용 펩타이드를 안정적으로 발현하고 체계적으로 방출하도록 조작된 키메라 T 세포는 COVID-19 및 기타 중증 전염병 환자를 치료하기 위한 새로운 전략이 될 수 있음을 확인하였다.
- [0035] 이하 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명한다. 그러나, 본 발명은 여기서 설명되는 실시예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있으며, 여기서 소개되는 내용은 본 발명의 사상을 충분히 전달하기 위해 제공하는 것이다.
- [0036] <실험재료 및 방법>
- [0037] 치료 펩티드 벡터의 제조
- [0038] 치료 펩타이드 PC-Gla-TACE-MMP-TRA(PMTT), 막관통 CD28 (CD28 TM), 공동 자극 CD28 (CD28 ED) 및 활성 세포질 도메인 (CD3 ζ)는 DNA 올리고 합성(Cosmo Genetech, 서울, 한국)을 사용하여 제작하였으며, 이후 CD28 TM, CD28 ED 및 CD3 ζ 작제물을 pCDH-CMV 이중 프로모터 렌티바이러스 벡터(Addgene)에 클로닝하였다. 그런 다음, PMTT 유전자를 신호(CD8 SP) 및 힌지(CD8 Hinge) 도메인 사이에 삽입하였다.
- [0039] 렌티바이러스 벡터 상청액의 생산, 적정 및 형질도입
- [0040] 렌티바이러스 벡터 상등액은 12-웰 플레이트에서 선형 PEI(linear polyethylenimine) 시약을 이용하여 1 mg의 렌티바이러스 전달 벡터 (대조군 T 세포의 경우 CD513B-1.CD28.CD3z, PMTT-T 세포의 경우 CD513B-1.PC-Gla.TACE CS.MMP1 CS.TRAP.CD28.CD3z를 각각 사용함), 0.5 mg의 Gag/Pol, 0.25 mg의 REV 및 0.25 mg of 수포성 구내염 바이러스 (VSV-G) 패키지 플라스미드를 Lenti-X 293T 세포(Takara Bio, 일본)에 공동 형질감염시켜 제작하였다. 형질 감염 후 48 시간이 지난 다음 상청액을 수집하고, 0.45mm 폴리 비닐 리덴 플루오라이드 (PVDF) 주사기 필터 (Corning Life Sciences, Tewksbury, MA, 미국)로 여과하였다. 역가는 형질 도입 3일 후, HT1090 세포를 폴리브렌(8 mg/mL^{-1}) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 미국) 및 BD FACS Fortessa (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 사용하여 유동 세포 계측법 분석으로 분석하였다. T 세포의 형질도입은 24웰 플레이트에서 웰 당 2×10^4 세포 에 대해 수행한 다음, 형질도입 3일 후 GFP 발현의 유세포 분석을 수행했다.
- [0041] 세포 배양
- [0042] Pan T 세포 분리 키트(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, 독일)를 사용하여 인간 T 세포를 분리하고 T 세포 분리 키트(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, 독일)를 사용하여 마우스 T 세포를 각각 분리하였다. 인간 및

마우스 T 세포 모두 10% 태아 송아지 혈청, 1% 페니실린-스트렙토마이신 및 100U IL-2가 보충된 RPMI 배지에서 유지하였다.

[0043] **혈장 샘플 수득**

[0044] COVID-19 환자의 혈장 샘플은 대한민국 대구 보건소에서 SARS-CoV-2 감염 진단을 받고 영남대학교 의료원에 입원한 환자의 전혈로부터 얻었다. COVID-19 패혈증 환자는 패혈증 합의 회의 위원회(Sepsis Consensus Conference Committee)에서 제공한 기준에 따라 영남대학교병원에 입원한 환자 중 패렴 및 패혈성 쇼크 환자 중에서 모집하였다. 대조군으로는 건강한 지원자의 혈장을 사용하였다. 전혈을 수집한 모든 환자에 대하여 이상 데이터를 수집하였다. 혈장 샘플은 전혈 채취 후, 12시간 이내에 2000 × g 에서 5분간 원심 분리하여 준비하였다. 인간 대상의 연구 프로토콜은 한국 대구 영남 대학 병원 임상심사위원회(YUH 2020-03-057, 2020-05-031-001)의 승인을 받았다. 본 발명에서 수행된 인간 혈액 관련 실험은 피험자의 완전한 사전 동의하에 수행되었으며, 연구에서 사용 승인을 받은 후 환자로부터 전혈을 채취했다. 또한, 병원에서 받은 혈액 샘플의 분석은 맹검으로 진행되었다. 코호트 연구를 기반으로, COVID-19 환자의 혈중 바이러스를 모니터링하여 중증 호흡기 질환이나 패혈증으로 진행되는지 확인하였다. 패혈증 합의 회의 위원회 기준에 따른 COVID-19 패혈증 환자의 세부 조건은 다음과 같다. [연령, 18세 이상; 아래 기준 중 적어도 하나를 포함하는 급성 발병 의학적 상태: 발열(간호사 분류에서 고막 온도 $\geq 38^{\circ}\text{C}$), 전신 감염 의심, 2개 이상의 전신 염증 반응 증후군(systemic inflammatory response syndrome, SIRS 기준), 저혈압(수축기 혈압 $< 90\text{ mmHg}$) 및/또는 쇼크]. 건강한 지원자를 대조군으로 사용했다. 모든 환자에 대해 임상 데이터를 수집하였다.

[0045] COVID-19 환자는 질병의 중증도에 따라 분류되었다. “경증(Mild)”은 일반병실에서 격리치료를 받거나 증상이 없는 환자를 말한다. “중증(Severe)”은 급성 호흡기 장애 증후군(Acute respiratory distress syndrome, ARDS), 패혈증 또는 ICU에서 집중 치료를 받는 환자를 말한다. 여기에는 산소 요법으로 치료를 받거나 기계식 호흡 기계(예, 인공호흡기)에 의존하는 환자도 포함된다. 이때 대부분의 중증 환자가 70세 이상의 고령자였다.

[0046] **PBMC 분리 및 배양**

[0047] 건강한 대조군, SARS-CoV-2 패렴 환자 또는 퇴원 환자의 혈액 샘플을 영남대학교 의료원에서 얻었으며, 이때 해당 지역의 임상시험심사위원회와 윤리위원회의 승인을 받았다. 헤파린 처리된 혈액 샘플은 4시간 이내에 신선한 상태에서 사용되었다. 말초 혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)는 제조업체의 권장 사항에 따라 Ficoll-Hypaque 또는 NycoPrep를 사용하여 혈액에서 분리되었다. 이후 MACSprep PBMC 분리 키트를 통해 더 정제된 PBMC를 얻었고 1mM 피루브산 나트륨, 2mM L-글루타민, 4.5 mgL^{-1} 글루코스, 10mM HEPES 및 2 mgL^{-1} 탄산수소나트륨이 포함된 RPMI-1640에서 배양했다.

[0048] **인간 용해성 EPCR ELISA**

[0049] EPCR 면역 분석 키트는 R&D Systems에서 구입했다. 구연산 처리된 혈장의 sEPCR 수준은 제조사의 지침에 따라 인간 ELISA 키트(Quantikine ELISA, R&D Systems, Minneapolis, MN, 미국)를 사용하여 결정하였다.

[0050] **웨스턴 블로팅**

[0051] GLA(Gamma-Carboxyglutamyl) 도메인은 PTMT-T 세포에서 면역블로팅에 의해 검출되었다. 분비된 GLA 도메인의 수준은 인간 MMP-1(Sigma, SPR3117)/TACE(Sigma, SRP6178) 처리 또는 중증 COVID-19 환자의 혈장 처리 PTMT-T 세포에서 평가되었다. EPCR 및 PAR-1은 중증 COVID-19 환자에서 분리된 PBMC 또는 LPS로 활성화된 HUVEC와 함께 공동배양된 PTMT-T 세포에서 면역블로팅으로 분석되었다. 나트륨 도데실 설페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 후, 단클론 마우스 GLA(Gamma-Carboxyglutamyl) 도메인 항체(ABIN124983, 항체-온라인 GmbH), EPCR/CD201 항체에 대한 토끼 다클론 항체(ab151403, Abcam, 영국), 및 단클론 마우스 PAR-1 항체(sc-13503, Santa Cruz, USA)를 이용하여 면역블로팅을 수행하였다.

[0052] **PTMT-T 세포의 특성 분석**

[0053] PC-Gla의 HPLC 분석은 온라인 진공 탈기 장치가 있는 바이너리 펌프, 자동 샘플 인젝터, 자동 온도 조절 컬럼 컴파트먼트 및 형광 검출기로 구성된 Dionex Ultimate 3000 HPLC 시스템(Sunnyvale, CA, USA)으로 수행되었다. 분석은 Gemini C-18 컬럼(250 × 4.6 mm id, 5 μm , Phenomenex, Torrance, CA)에서 수행하였으며, 이동상은 0.1% 트리플루오로아세트산(trifluoroacetic acid, TFA)을 함유하는 탈이온수(용리액 A) 및 0.1% TFA를 함유하는 아세트니트릴(용리액 B)로 구성하였고, 30-60%(v/v) 용리액 B의 선형 구배 용리를 20분 동안 적용했다. 유속

은 1.0 mLmin^{-1} 이었으며, 시료 주입량은 $20 \mu\text{L}$ 였다. 각 구조 모노머의 질량 스펙트럼은 매트릭스 보조 레이저 탈착 이온화 비행 시간(MALDI-ToF)으로 확인하였다. MALDI-ToF MS는 Bruker Daltonics Microflex MALDI-ToF 질량 분석기(Bremen, Germany)와 337nm 질소 레이저를 사용하여 수행되었다. 질량 스펙트럼은 가속 전압 20kV 의 선형 및 양이온 모드에서 얻었다. 0.1% 트리플루오로아세트산의 최종 농도를 포함하는 50% 아세토니트릴 중의 α -시아노-4-하이드록시신남산(α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, CHCA) 또는 시넵산(sinapic acid)의 포화 용액을 매트릭스 용액으로 사용하였다. 효소 소화 후 단편 분석을 위해 CHCA 매트릭스, 온전한 단백질 분석을 위해 시넵산 매트릭스를 사용하였다. 분석물-매트릭스 용액은 $1:2$ (분석물:매트릭스, v/v)의 비율 하고, 각 혼합물을 완전히 혼합한 후, $1 \mu\text{L}$ 의 분석 물질-매트릭스 용액을 샘플 플레이트에 놓고 진공 증발로 건조하였다. SEM 이미징을 위해 세포를 DPBS로 세 번 세척한 후, 0.1 M sodium cacodylate 및 0.1 M 수크로스로 4°C 에서 30분 동안 고정하였다. 이후, 증류수로 5분간 세척한 후 50% , 75% , 90% , 100% 에탄올 용액을 5분씩 순차적으로 첨가하여 세포를 탈수시켰다. 그런 다음 세포를 후드 내부의 실온에서 15분 동안 hexamethyl disilazane, HMDS)에 침지시킨 후, 샘플을 건조하고, 측정 전에 기판을 Pt으로 20 nm 두께로 스퍼터 코팅하였다. SEM 이미지는 HITACHI S-4800 현미경(Hitachi, Japan)을 사용하여 얻었다.

[0054] PAR-1 절단 분석

[0055] 24-웰 플레이트에서 90% 컨플루언스의 HUVEC를 제조업체의 지시에 따라 Lipofectamine(Invitrogen, USA)을 사용하여 무항생제 Opti-MEM 배지에서 ALP-PAR-1-TF-cDNA를 포함하는 pRc/RSV로 일시적으로 형질감염시켰다. 다음 날 세포를 세척하고 무혈청 배지에서 5시간 동안 배양하였다. 이후, 세포를 트롬빈, TRAP, TFG 또는 TFMG와 함께 추가 시간 동안 배양했다. 세포 배양 후 얻은 배지를 원심분리하여 상등액을 수집하고 제조사의 지침에 따라 EnzoLyte™ p-nitrophenyl phosphate alkaline phosphatase assay kit(AnaSpec, San Jose, CA, USA)를 사용하여 PAR-1 activation을 측정하여 ALP-PAR-1이 존재함을 확인하였다.

[0056] 조작된 혈관 실험

[0057] 조작된 혈관(Engineered Blood Vessel)의 제작 및 투과성 분석은 Kim 등(2015)의 방법을 응용하여 수행하였다. 간단히 설명하면, 미세 바늘을 주형으로 사용하였으며, 졸 상태 유형 I 쥐 꼬리 콜라겐 (Corning, Bedford, MA, USA)에 삽입하고 겔화 후 제거하여 콜라겐 마이크로 채널을 제작하고, 인간 제대 정맥 내피 세포를 콜라겐 채널의 내강 표면에 시딩한 다음 5일 동안 배양하여 단단한 혈관 구조를 제작하였다. 제작된 관류성 혈관에 40kDa FITC-Dextran 용액($10 \mu\text{M}$, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, 미국)를 주입하고 공초점 현미경(LSM700, Zeiss, Jena, Germany)을 사용하여 분자 수송을 모니터링하여 투과성을 분석하였다. 이때 획득한 이미지를 사용자가 작성한 MATLAB(MathWorks) 코드로 색상 매핑하고 형광 강도를 임의의 단위로 표시하였다. 마이크로채널 전체의 평균 형광 강도 값도 맞춤 작성된 MATLAB(MathWorks) 코드로 분석했다. 조작된 혈관에서 COVID-19 매개 염증을 유도하기 위해 중증 COVID-19 환자의 혈장을 혈관에 도입하고 2시간 동안 배양했다. SARS-CoV-2 환자의 혈장은 쉽게 응고되기 때문에 주입 전에 충분한 유동성을 확보하기 위하여 $1:2$ 비율(혈장:배지)로 희석하였다.

[0058] 사이토카인 프로파일링

[0059] 환자 혈액에서 분리한 PBMC를 PTMT-T 세포(5×10^3)로 12시간 동안 처리하였다. 정상 또는 중증 COVID-19 환자의 혈장 풀은 Human XL 사이토카인 분석 키트(R&D Systems, MN, USA)에 표시된 대로 처리하여, 현상된 필름을 스캔하고 얻은 이미지를 ImageJ 버전 1.43을 사용하여 사이토카인을 분석했다.

[0060] NF- κ B 활성

[0061] NF- κ B 활성은 핵 추출물을 준비하여 Xu 등(2013)의 방법을 응용하여 TransAM 분석을 통해 측정하였다. 개별 NF- κ B 서브유닛의 활성은 NF- κ B Family Transcription Factor Assay Kit(43296; Active Motif, Carlsbad, CA, 미국)를 사용하여 ELISA를 통해 결정되었다. 간략하게 설명하면, 핵 추출물($2 \mu\text{g}$)을 NF- κ B 컨센서스 올리고뉴클레오타이드로 코팅된 96웰 플레이트의 웰에 넣은 후, 플레이트를 NF- κ B 1차 항체와 함께 배양한 다음, 키트에 포함된 HRP-접합 2차 항체를 사용하여 검출했다. 분석은 Tecan Spark 마이크로플레이트 판독기(Tecan, Austria GmbH, Austria)를 사용하여 450 nm 에서의 광학 밀도(OD)를 측정했다.

[0062] 염증성 사이토카인 IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IFN- γ 및 TNF- α 의 ELISA

[0063] 인간 ELISA 키트(Quantikine ELISA, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 SARS-CoV-2 감염 환자에서 혈청 내 수준을 측정하였다. 환자 혈액에서 분리한 PBMC를 PTMT-T 세포(5×10^3)로 12

시간 동안 처리하였고, 결과는 pgmL^{-1} 로 표현하였다.

[0064] **WST-1 세포 증식 분석**

[0065] WST-1(water-soluble tetrazolium-1) 시약을 웰당 10 μL 를 정제된 PBMC에 첨가하고 37° C, 5% CO_2 에서 배양했다. 지정된 시점에 Tecan Spark 마이크로플레이트 판독기에서 480 및 600 nm(배경)에서 흡광도를 측정했다.

[0066] **동물실험**

[0067] 수컷 C57BL/6 마우스(생후 6-7주, 체중 18-20g)를 오리엔트바이오(대한민국 경기도 성남)에서 구입하여 12일간의 순화 기간을 거친 후 실험에 사용하였다. 폴리카보네이트 우리당 5마리의 동물을 12:12시간 명/암 주기로 조절된 온도(20-25 °C) 및 습도(40-45%) 하에 수용하고 정상적인 설치류 펠릿 사료를 공급하고 물을 자유롭게 공급했다. 모든 동물은 충남대학교에서 발행한 실험동물 관리 및 사용 지침에 따라 처리하였다.

[0068] **맹장 결찰 및 천자**

[0069] Rittirsch 등(2008)의 방법에 따라 맹장 결찰 및 천자(Cecal Ligation and Puncture, CLP)로 유도된 패혈증 마우스 모델을 준비하였다. 간략하게 설명하면, 준비된 수컷 C57BL/6 마우스를 2cm 정중선 절개하여 맹장과 인접한 장을 노출시킨 후, 맹장 끝에서 5.0 mm 떨어진 부분을 3.0 실크 봉합사를 사용하여 단단히 결찰하고, 22 게이지 바늘로 구멍을 뚫은 다음, 부드럽게 압박하여 천공 부위에서 대변을 밀어냈다. 이후, 맹장을 복강으로 되돌리고 개복 부위를 4.0-silk를 사용하여 봉합했습니다. 삼 수술은 동물의 맹장을 외과적으로 노출시켰지만 결찰하거나 구멍을 뚫지 않은 다음 복강으로 되돌려 놓았다. 수컷 C57BL/6 마우스는 CLP를 받은 후 CLP 후 12, 24, 48시간에 PTMT-T(1, 2.5 또는 5×10^3 세포)를 꼬리 정맥에 주사했다(n= 5). CLP 처리 72시간 후 마우스를 안락사시켰다.

[0070] **헤마톡실린 및 에오신 염색**

[0071] CLP 수컷 C57BL/6 마우스는 CLP 후 12시간에 PTMT-T 세포를 정맥내 투여하고(n=5), 96시간 후 안락사시켰다. 마우스 폐의 표현형 변화를 분석하기 위해 각 마우스에서 폐 샘플을 채취하고 PBS(pH 7.4)로 3회 세척하여 남아있는 혈액을 제거한 후, 4% 포름알데히드가 포함된 7.4 pH PBS 용액(Junsei, Tokyo, 일본)에서 4°C에서 20시간 동안 고정시켰다. 고정 후 샘플을 에탄올 시리즈를 통해 탈수하고 파라핀에 포매한 다음, 4 μm 두께로 절편하여 슬라이드에 놓았다. 슬라이드를 60°C 오븐에서 탈파라핀 처리하고 재수화한 다음, 헤마톡실린(Sigma, Saint Louis, MO, 미국)으로 염색했다. 과도한 염색을 제거하기 위해 슬라이드를 0.3% 산성 알코올에 3회 빠르게 담그고 에오신(Sigma, Saint Louis, MO, USA)으로 대조 염색했습니다. 이후, 에탄올 계열과 크실렌으로 세척한 다음 커버 슬립했다.

[0072] **생체 내 투과성 및 백혈구/호중구 이동 분석**

[0073] CLP 수술 마우스에 PTMT-T 세포를 정맥 주사하였다. 12시간 후, 1% 에반스 블루 염료 용액을 포함한 생리 식염수를 각 마우스에 정맥 주사하였다. 30분 후 마우스를 희생시키고 생리 식염수(5 mL)로 세척한 후 복막 삼출물을 채취하고 $200 \times g$ 에서 10분 동안 원심분리하였다. 상청액의 흡광도는 650nm에서 판독되었다. 혈관 투과성은 Evans blue 염료의 표준곡선에 따라 복막강으로 새는 염료(마우스당 μg)로 표현하였다. 백혈구/호중구 이동의 평가를 위해, CLP 수술 마우스를 CLP 수술 12시간 후에 PTMT-T 세포로 처리하였다. 이후, 마우스를 희생시키고 0.8mL의 생리 식염수로 기관지 폐포를 세척하여 기관지 폐포 세척액(bronchoalveolar lavage, BAL)을 수득하였다. BAL 액(200 μL)은 성균관대학교 키랄소재핵심시설센터에서 자동혈액분석기(Mindray, BC 5000 Vet)로 측정하였다. 결과는 BAL 유체당 백혈구/호중구 $\times 10^5$ 로 표현되었다.

[0074] **ICAM의 발현**

[0075] 폐 조직에서 세포간 접착 분자-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)의 발현을 직접 ELISA로 측정했다. 용해된 폐 조직을 Nunc-Immuno MicroWell 96 웰 플레이트에 코팅하고 4°C에서 밤새 배양했다. 이를 세척 후, 항-마우스 단일클론 ICAM-1 항체(Millipore Corporation, Billerica, MA, 미국, 각각 1:50)를 첨가하고 1시간 후(37°C, 5% CO_2), 세포를 3회 세척한 다음, 1:2000 peroxidase-conjugated anti-mouse IgG 항체(100 μL ; Sigma, Saint Louis, MO, 미국)를 1:2000 첨가하여 1시간 배양하였다. 이후 세포를 다시 3회 세척하고 o-페닐렌디아민 기질(Sigma, Saint Louis, MO, 미국)을 사용하여 발색시켰다. 비색 분석은 490nm에서 흡광도를 측정하는 것으로 수행되었으며, 모든 측정은 삼중 웰에서 수행되었다.

[0076] **패혈증 마우스 혈장 내 임상 화학 사이토카인 수준**

[0077] 신선한 혈청을 생화학 키트(Mybiosource, San Diego, USA)를 사용하여 아스파르트산 트랜스아미나제(aspartate transaminase, AST), 알라닌 트랜스아미나제(alanine transaminase, ALT), 혈액 요소 질소(blood urea nitrogen, BUN), C-반응성 단백질(C-reactive protein, CRP) 및 젖산탈수소효소(Lactate Dehydrogenase, LDH)를 분석하였다. IL-1 β , IL-6, IL-8 및 TNF- α 의 농도는 시판되는 ELISA 키트를 사용하여 제조업체의 프로토콜(R&D Systems, MN, USA)에 따라 수행하고 ELISA 플레이트 판독기(Tecan, Austria GmbH, Austria)를 사용하여 측정되었다.

[0078] **통계 분석**

[0079] 모든 시험관 내 및 생체 내 데이터는 GraphPad 프리즘 8 소프트웨어를 사용하여 양측 짝이 없는 t-테스트를 통해 분석되었다. 준비된 표본 크기는 $n \geq 3$ 이었고 통계적 유의성은 $P < 0.05$ 로 설정되었다. 모든 데이터 정규화 프로세스는 제조업체의 프로토콜에 따라 수행되었다.

[0080] **<결과>**

[0081] **치료 펩티드-발현 키메라 T 세포 설계**

[0082] 도 1a는 본 발명에 따른 치료 펩타이드-발현 T 세포가 혈관 및 조직 염증에 나타내는 효과를 도식화한 것이다. 도 1b (i)와 같이, PTMT-T 세포에 MMP1 및 TACE 반응성 절단 부위를 도입하여 체내 순환 동안 치료용 펩타이드가 MMP 및 TACE에 의한 효소적 분해를 방지하도록 하였다. T 세포의 표면에는 치료 펩티드 단백질 C의 γ -카르복시글루탐산(PC-G1a) 및 트롬빈 수용체 작용제 펩티드(TRAP)와 함께 매트릭스 메탈로펩티다제1(MMP1) 및 종양괴사인자 알파 전환 효소(TACE)에 반응하는 절단 부위를 포함하는 다중 구조의 펩타이드를 갖는다. 이러한 펩타이드 발현 T 세포를 투여하면 TACE와 MMP1이 절단 부위와 상호작용하게 된다. 이후 도 1b (ii)와 같이, 방출된 PC-G1a는 세포막에 노출된 EPCR에 결합하고, 세포 결합 TRAP는 막관통 단백질 PAR-1에 결합한다. 이러한 펩타이드-수용체와 펩타이드-막관통 단백질 상호작용은 궁극적으로 염증과 세포사멸을 억제함으로써 치료 효과를 나타내게 된다(도 1c).

[0083] **PTMT-T 세포 제작 및 PC-G1a 발현 검증**

[0084] 상기의 치료 펩티드-발현 키메라 T 세포를 제작하기 위하여 도 2a와 같이PTMT(PC-G1a-TACE-MMP-TRAP)-T 세포의 표면 발현 펩티드의 백터를 디자인하고 이를 하기 표 1에 나타내었다.

[0085] 하기 표 1의 서열은 PC-G1a-TACE-MMP-TRAP의 순서로 융합된 펩타이드 서열을 나타내며, 각 펩타이드 단편 사이에 필요한 경우 링커 등으로 연결될 수 있다.

표 1

서열 번호	명칭		서열	비고
1	PC-G1a	Peptide	ANSFLEELRHSSLERECIEEICDFEEAKEIFQNVDDTLAFWSKHV	Ligand
		DNA	GCCAATAGCTTCTCGGAAGAACTGCGGCACAGCAGCCTGGAAAGAGAGTGCA TCGAGGAAATCTGCGACTTCGAGGAAGCCAAAGAAATCTCCAGAACGTGGA CGACACCCTGGCCTTTTGGAGCAAGCACGTT	
2	TACE	Peptide	HISAENTK	Cleavage sites
		DNA	CACATCTCTGCCGAGAATACCAAA	
3	MMP1	Peptide	TLDPR	
		DNA	AACTGGATCCTAGA	
4	TRAP	Peptide	TFLLRN	Active domain
		DNA	ACCTTCTGCTGAGAAAT	

5	Total	Peptide	MALPVTALLLPLALLLHAARP ANSFLEELRHSSLERECIEEICDFEEAKEIFQNVDDTLAFWSKHV GGGSEGGGSE-S HISAENTK GGGSE TLDPR -S TFLLRN ALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEASRPAAGGAVHTRG LD	fusion peptide
	CD8a - PC-G1a - Linker - TACE cleavage site - Linker - MMP1 Cleavage site -TRAP CAR Hinge	DNA	ATGGCTCTGCCTGTTACAGCTCTGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCTTCTGCAT GCTGCTAGACCT GCCAATAGCTTCTGGAAGAACTGCGGCACAGCAGCCTGGAAGAGAGTGA TCGAGGAAATCTGCGACTTCGAGGAAGCCAAAGAAATCTTCCAGAACGTGGA CGACACCCTGGCCTTTTGGAGCAAGCACGTT GGCGGAGGATCAGAG GGCGGCGGATCTGAA TGATCA CACATCTCTGCCGAGAATACCAAA GGCGGAGGCAGCGAG ACACTGGATCCTAGA TGATCA GGCGGAGGCAGCGAG ACCTTCTGCTGAGAAAT GCCCTGAGCAACAGCATCATGTACTTCAGCCACTTCGTGCCCGTGTCTTCTGC CCGCCAAGCCTACAACAACCCCTGCTCCTAGACCACCTACACAGCTCCTAC AATCGCCAGCCAGCCTCTGTCTCTGAGGCCTGAAGCTTCTAGACCAGCTGCT GGCGGAGCCGTGCATACCAGAGGACTTGAT	

[0088] 상기 PTMT-T 세포의 표면 발현 펩티드는 PC-G1a 및 TRAP의 치료 도메인과 함께 TACE 및 MMP1 반응 절단 부위가 삽입된다. 상기 디자인을 갖는 렌티바이러스 벡터로 T 세포를 형질전환시켰다. 렌티바이러스 벡터 처리 시 PTMT-T 세포에서 MOI(Multiplicity of Infection) 의존적 형질도입 효율은 도 2b에 나타낸 바와 같았다.

[0089] 또한, 도 2c에 나타낸 바와 같이, 웨스턴 블롯 분석을 통해 PTMT-T 세포에서 배양 시간이 지남에 따라, 즉 시간 및 세포수 의존적으로 PC-G1a의 발현 수준이 증가하는 것을 확인함으로써 PTMT-T 세포가 PC-G1a를 안정적으로 발현하는 것을 확인하였다. 그리고 도 2d에 나타낸 바와 같이, 면역형광 검증을 통하여 본 발명의 PTMT-T 세포가 세포막에서 PC-G1a를 발현하는 것을 확인했다. 또한, 도 2e에 나타낸 바와 같이, 주사 전자 현미경(SEM) 이미지는 형질도입 후 PTMT-T 세포가 대조군 T 세포와 현저한 형태학적 차이를 나타내지 않은 것을 확인하였다.

[0090] MMP1 및 TACE의 존재 시 PC-G1a가 방출 확인

[0091] 상기 제작된 PTMT-T 세포에서 의 MMP1 및 TACE의 존재 하에 다단계 펩티드로부터 PC-G1a가 방출되는지 여부를 확인하였다. PTMT-T 세포에 TACE/MMP1, 정상 혈장, 패혈증 쇼크 환자의 혈장 또는 중증 COVID-19 환자의 혈장을 넣고 배양한 후, PC-G1a의 방출여부를 면역블롯팅을 사용하여 확인하고 그 결과를 도 3a에 나타내었다. 도 3a에서 보는 바와 같이, PTMT-T 세포에 MMP1과 TACE를 처리하였을 때 방출된 PC-G1a가 확인되었다. 또한, 건강한 상태에서는 PC-G1a가 방출되지 않았으나, PTMT-T 세포를 패혈성 쇼크 및 중증 COVID-19 환자의 혈장에 노출시켰을 때, PC-G1a가 관찰되었다. 이는 감염병 상황에 대응하여 PC-G1a가 효과적으로 방출되었음을 시사한다.

[0092] 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)(도 3b) 및 ELISA(도 3c)를 사용하여 패혈성 쇼크 및 COVID-19 환자의 혈장에 노출 시 PTMT-T 세포에서 PC-G1a의 방출을 검증한 결과, PTMT-T 세포에서 절단된 PC-G1a의 농도는 배양 15분 후 200 nM를 초과한 후 30분 배양 후 300 nM까지 지속적으로 증가하였다.

[0093] MMP1에 의한 PTMT-T 세포 교대 EPCR 웨딩

- [0094] 중증 COVID-19 환자의 혈장에 대한 ELISA 분석에서 COVID-19의 중증도가 증가함에 따라 가용성 내피 단백질 C 수용체(sEPCR)의 농도가 증가하는 것을 발견했다(도 4a) 또한, sEPCR의 농도는 생존한 경우에 비해 사망한 개체에서 더 증가하는 것으로 나타났다(도 4b). 컴퓨터 단층촬영(CT) 이미지 분석에서도 혈장 내 높은 수준의 sEPCR의 경우, 폐 조직에서 더 높은 염증을 나타내는 것으로 확인되(도 4c) 혈장 분석 결과를 뒷받침하였다. 이러한 결과는 증가된 sEPCR 수준이 혈관 손상에서 비롯되기 때문으로, 이에 따라 COVID-19 환자의 sEPCR 수준은 임상 결과와 높은 상관관계를 나타내게 된다. 즉, 감염 후 중증 염증 단계에서는 막에 결합된 EPCR이 손상되어 막으로부터의 박리로 인해 가용성 형태 sEPCR가 증가하게 된다.
- [0095] 이에 따라 본 발명의 PTMT-T 세포가 호중구 포함 PBMC 및 인간 체대 정맥 내피 세포(HUVEC)에서 막 결합 EPCR의 손상을 예방할 수 있는지 확인하였다. PTMT-T 세포를 중증 COVID-19 환자의 PBMC 및 LPS로 염증 유도한 HUVEC와 공동배양한 후, EPCR 및 PAR-1의 발현양을 ELISA를 통해 확인하고 그 결과를 도 4d에 나타내었다.
- [0096] 본 실험에서 PTMT-T 세포는 중증 COVID-19 환자의 PBMC와 직접 접촉하지 않고(즉, 촉분비 매개 상호작용) 공동 배양되었으며, 중증 COVID-19 환자의 PBMC에서 EPCR의 발현 수준은 웨스턴 블롯으로 분석하였다. 또한, PAR-1의 발현 수준을 분석하여 염증의 원인이 되는 막관통 단백질의 보호에 대한 PTMT-T 세포의 효과를 확인했다. 도 4d에서 보는 바와 같이, 중증 COVID-19 환자의 말초 혈액 단핵세포(Peripheral Blood Mononuclear Cell, PBMC) 및 LPS-처리된 인간 태줄 정맥 내피 세포(Human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)의 EPCR 및 PAR-1의 발현 수준은 PTMT-T 세포의 수가 증가함에 따라 증가하였다. 또한 PTMT-T 세포는 LPS(lipopolysaccharide)로 자극된 HUVEC에서 EPCR과 PAR-1을 보호했다.
- [0097] 또한 상기 실험에서 중증 COVID-19 환자의 PBMC 배양 배지와 LPS 처리된 HUVECs 배지에서 가용성 EPCR(sEPCR)의 농도를 측정하여 도 4e 및 도 4f에 각각 나타내었다. 도 4e 및 도 4f에서 보는 바와 같이, sEPCR 수준은 중증 COVID-19 환자의 PBMC 배양 배지와 LPS 처리된 HUVECs 배지 각각에서 PTMT-T 세포를 공동 배양했을 때 감소한 것을 확인하였다.
- [0098] 또한 PAR-1을 활성화하는 것으로 알려진 트롬빈 및 TRAP과 본 발명에 따른 PTMT-T 세포의 PAR-1 절단 활성을 비교하고 그 결과를 도 4g에 나타내었다. 도 4g에서 보는 바와 같이, PTMT-T 세포의 TRAP은 TACE 및 MMP1의 존재 하에서 내피 세포의 PAR-1을 활성화할 수 있음을 보여주었다.
- [0099] PTMT-T 세포의 혈관 보호 능력은 HUVEC를 사용하여 제작된 혈관 온 칩 플랫폼을 사용하여 검증하였다. 도 5a와 같이 조작된 혈관을 제작하고, 장벽 기능의 비교를 위해 형광 이미지를 사용자가 작성한 MATLAB 코드로 색상 매핑하고 임의의 단위로 색상을 표시하였다. 상기 조작된 혈관에 중증 COVID-19 환자의 혈장 또는 종양 괴사 인자- α (TNF- α)(결과 미도시)를 2시간 동안 도입하는 경우 혈관 장벽이 훼손되었다. 이때 본 발명에 따른 PTMT-T 세포를 도입하는 경우, 조작된 혈관의 장벽 기능을 회복하는 것을 확인하였다. 상기 이미지를 정량 분석하여 도 5b에 나타내었다.
- [0100] 상기 결과에서 보는 바와 같이 본 발명에 따른 PTMT-T 세포는 PBMC 및 HUVEC에서 EPCR 및 PAR-1을 보호하고 시험관 내에서 혈관 무결성의 회복을 돕는다는 것을 확인하였다.
- [0101] **PTMT-T 세포의 사이토카인 방출 증후군을 억제 효과 확인**
- [0102] 본 발명의 PTMT-T 세포의 중증 COVID-19 환자의 PBMC 및 LPS 처리 HUVEC에서 사이토카인 방출 증후군 억제 효과를 평가하였다. 중증 COVID-19 환자의 PBMC는 직접적인 접촉(즉, 촉분비 매개 상호작용) 없이 PTMT-T 세포와 함께 배양되었고 사이토카인 어레이를 통해 배양 배지에서 염증성 사이토카인의 배수 변화를 정량화했다. 도 6에서 보는 바와 같이 사이토카인 어레이 결과는 PTMT-T 세포가 IL-4, IL-8, IL-1 β 및 TNF- α 를 포함하는 사이토카인 폭풍과 관련된 사이토카인 분비를 감소시킨다는 것을 보여주었다.
- [0103] 또한, 상기 PBS 및 본 발명에 따른 PTMT-T 세포를 중증 COVID-19 환자의 PBMC 또는 LPS 처리된 HUVEC와 공동 배양 시 방출된 사이토카인의 ELISA 결과를 도 7a 내지 도 7g 및 도 8a 내지 도 8g에 나타내었다. 상기 결과에서 보는 바와 같이, PTMT-T 세포는 중증 COVID-19 환자의 PBMC 또는 LPS 처리된 HUVEC 모두에서 NF- κ B 활성을 억제하였으며, 염증성 사이토카인 IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IFN- γ 및 TNF- α 의 발현 수준을 현저히 억제하였다. 즉, 본 발명에 따른 PTMT-T 세포가 중증 COVID-19 환자의 PBMC 및 LPS 처리 HUVEC에서 염증 관련 신호 경로 NF- κ B를 하향 조절하고 사이토카인 폭풍을 억제할 수 있음을 분명히 보여준다.
- [0104] **PTMT-T 세포의 패혈증 동물모델에서 생존율 및 조직 손상 개선 확인**
- [0105] 본 발명에 따른 PTMT-T 세포의 생체 내 검증을 위해 맹장 결찰 및 천자(CLP) 마우스 모델을 적용했다. CLP 모델

은 가장 널리 사용되는 패혈증 모델로 사이토카인 폭풍, 심한 염증 및 다발성 장기 부전을 포함하여 COVID-19 및 패혈증과 임상적으로 관련된 시그니처를 나타낸다. CLP 수술은 96시간 이내에 마우스 모델의 사망을 유도했다. CLP를 받은 마우스는 CLP 후 12, 24, 48시간에 PC-G1a 및 TRAP, Naive T 세포 또는 본 발명에 따른 PTMT-T 세포(5×10^3 세포)를 꼬리 정맥에 주사하고 생존율을 관찰하여 도 9a에 나타내었다. 도 9a에서 보는 바와 같이, 정맥 주사를 통해 PC-G1a 및 TRAP 직접적인 투여하거나 Naive T 세포를 투여한 경우 생존율은 증가하지 않았으나 본 발명에 따른 PTMT-T 세포는 생존율을 70%까지 구제하였다

[0106] 상기 CLP 패혈증 마우스 모델의 폐 조직의 헤마톡실린 및 에오신(H&E) 염색 결과를 도 9b에 나타내었다. 도 9b에서 보는 바와 같이, 본 발명에 따른 PTMT-T 세포는 혈관 손상 및 폐 조직 염증을 예방함을 보여주었다. 그러나 PC-G1a와 TRAP의 직접적인 투여는 폐조직 손상을 억제할 수 없었다.

[0107] 상기 CLP 패혈증 마우스 모델의 혈관 통합 파괴 정도는 복막 삼출물 분석을 통해 복막강으로 새는 에반스 블루 염료 농도로 확인하여 도 9c에 나타내었다. 또한 상기 CLP 패혈증 마우스 모델의 폐조직을 적출하여 폐 세포간 접착 분자(ICAM)-1의 발현을 ELISA를 통해 확인하고 그 결과를 도 9d에 나타내었다. 도 9c 및 도 9d에서 보는 바와 같이, PTMT-T 세포의 투여는 혈관 통합 파괴 정도 및 폐 세포간 접착 분자(ICAM)-1의 발현을 정상 범위로 회복시켰다.

[0108] 상기 CLP 마우스를 희생시키고 기관지폐포 세척액(bronchoalveolar lavage, BAL)을 수득한 다음, BAL 내의 호중구(neutrophil) 및 백혈구(Leukocyte)를 확인하여 호중구 및 백혈구 이동을 확인하였다. 도 9e 및 도 9f에서 보는 바와 같이, CLP 유도로 증가한 호중구 및 백혈구 이동은 본 발명에 따른 PTMT-T 세포에 의하여 정상 범위로 회복되었다. 또한 상기 CLP 마우스에서 수득한 혈청으로부터 sEPCR 농도를 확인하고 도 9g에 나타내었다. 도 9g에서 보는 바와 같이, CLP 수술로 증가한 sEPCR의 농도는 PTMT-T 세포 투여에 의하여 정상 범위로 회복되었다.

[0109] 상기 CLP 마우스에서 수득한 혈청으로부터 조직 손상 마커인 C-reactive protein(CRP), lactate dehydrogenase(LDH), alanine aminotransferase(ALT), aspartate aminotransferase(AST) 및 BUN의 농도를 확인하고 그 결과를 도 9h 내지 도 9l에 나타내었다. 도 9h 내지 도 9l에서 보는 바와 같이, CRP, LDH, ALT, AST 및 BUN의 농도는 CLP 수술로 증가하였으며, PTMT-T 세포 투여에 의하여 정상 범위로 회복되었다.

[0111] 지난 10년 동안 펩타이드 기반 치료제는 지속적으로 관심의 대상이 되어 왔다. 그러나 체내 순환 중 기능 상실 하면서 짧은 반감기를 나타내면서 치료 펩타이드의 효과를 발휘하는 데에 한계가 있었다. 이에 따라 반감기의 연장은 펩타이드 기반 치료제 분야에서 극복해야 할 핵심 과제 중 하나가 되었다.

[0112] 본 발명은 조작된 T 세포의 세포 표면에서 PC-G1a 및 TRAP 치료 펩티드를 안정적으로 발현하도록 하였으며, 상기 펩타이드가 MMP 및 TACE 반응성 절단 부위를 갖도록 설계되어 유리 형태의 PC-G1a를 방출함으로써 절단되지 않는 형태보다 더 높은 수준의 항염증 활성을 제공할 수 있다. 또한 TRAP을 세포 표면에 붙인 상태로 둠으로써 염증 부위에 보다 효율적으로 작용할 수 있다. 특히, PTMT-T 세포는 패혈성 마우스 모델에서 전신 염증을 완화하고 사망률을 감소시키는 것을 확인하였으며, 펩타이드 치료제를 단발로 직접 투여하는 것과 비교하여 효능이 현저히 향상된 것을 확인하였다. 이러한 세포 표면의 다단계 펩타이드에 절단 가능한 부위 통합을 통하여 생체 내 조건에서 불가피한 효소 분해를 피할 수 있다. 뿐만아니라, CD28 공동자극 도메인을 CD3 활성화 세포질 도메인과 통합하여 조작된 T 세포에 일부 면역 활성화를 부여함으로써 주변 미세 환경에 사이토카인을 분비할 수 있는 잠재력을 부여하는 이점을 추가했다. 이는 감염 시 T 세포 집단이 감소하기 때문에 감염된 환경에서 자극된 T 세포를 보충하는 효과를 나타낼 수 있다.

[0113] 이와 같은 조작된 펩티드 발현 키메라 T 세포의 개념은 아직 보고되지 않았으며, PTMT-T 세포가 탈과립화(degranulation) 및 용해성 과립의 방출(release of lytic granules)을 피하면서 낮은 수준의 사이토카인 방출을 유도하는 점에서 키메라 항원 수용체-T(CAR-T) 기술과 다르다. PTMT-T 세포의 목적은 표적 세포를 제거하는 것이 아니라 과사이토카인염증, 혈관 손상, 폐 조직 부전 등을 억제하여 정상 세포를 보호하는 것이며, 이러한 점에서도 직접적인 세포 사멸 유도를 목표로 하는 CAR-T와는 차이가 있다.

[0114] 본 발명의 조작된 키메라 T 세포 요법은 시험관 내 및 생체 내에서 COVID-19 및 패혈증 치료에 유망한 효과를 보여주었다. 즉, PTMT-T 세포의 투여가 NF- κ B 신호의 하향 조절 및 혈관 손상의 회복과 병행하여 사이토카인 폭풍을 억제할 수 있음을 보여주었다. 특히 마우스 모델에서는 생존율을 증가시키고, 사이토카인 폭풍을 억제하

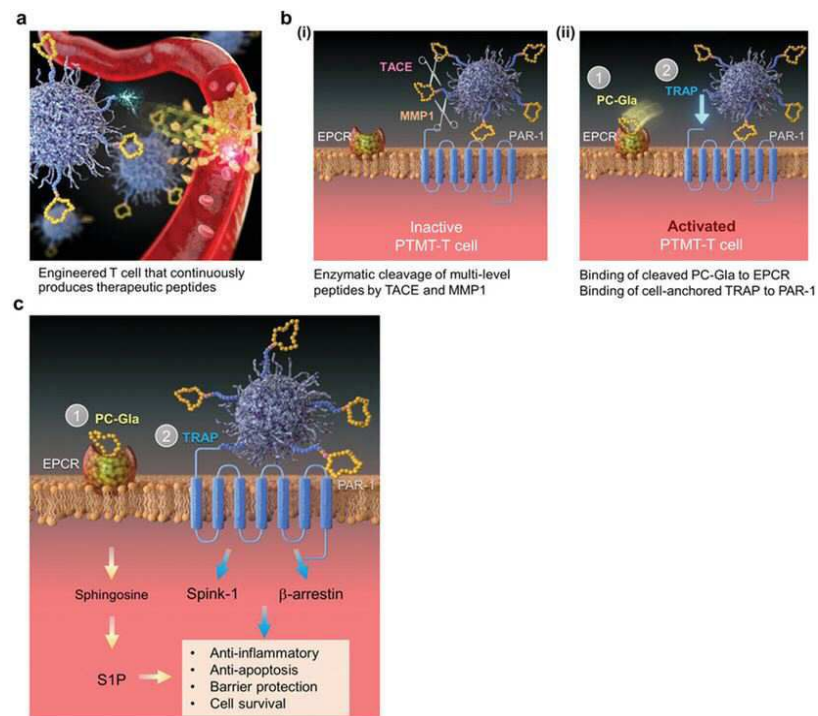
며 조직 손상을 예방하는 점이 관찰되었다.

[0116]

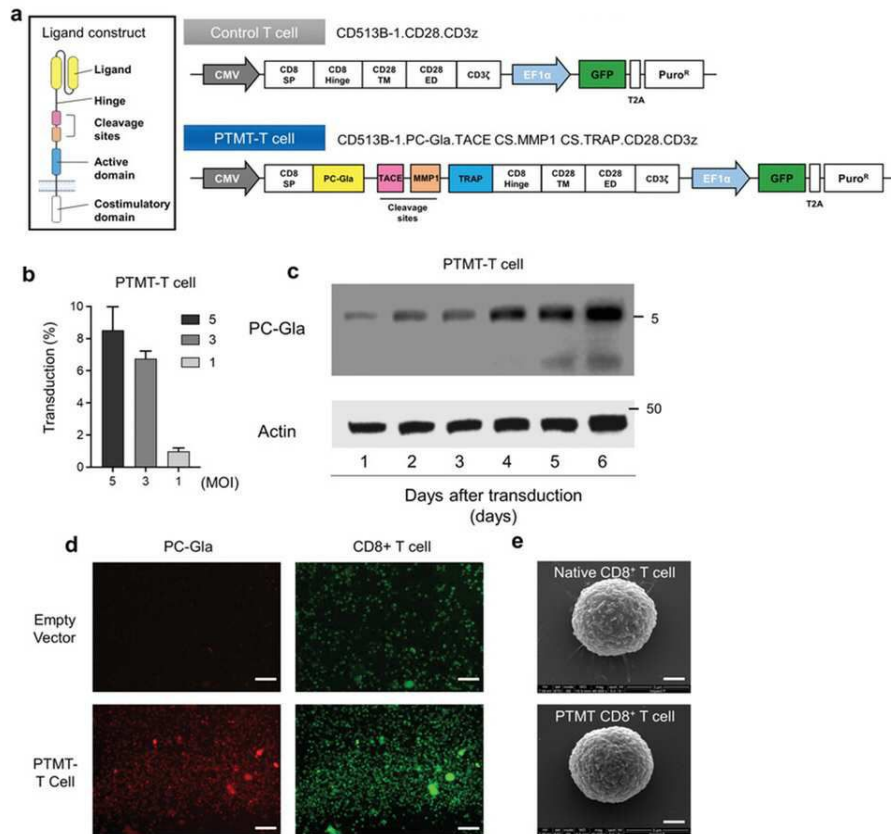
CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포는 SARS-CoV-2의 N 단백질을 인식하고 적응 면역을 활성화하기 때문에 건강한 T 세포를 보충하고 T 세포 수를 회복하기 위해 PTMT-T 세포 치료 전략을 사용할 수 있다. Kusnadi 등(2021)에 의하면 중증 COVID-19 환자의 혈액을 관찰한 결과 림프구, 특히 T 세포 수가 감소하며, COVID-19 환자에서 CD8⁺ T 세포가 고갈되는 것으로 관찰되었다. 이에 따라 본 발명의 조작된 키메라 T 세포 기술은 T 세포를 직접 주입하는 방법으로 면역 활성화를 유도하며 감소된 T 세포를 보충할 수 있다. 또한 환자유래 T세포를 활용하면 면역거부반응 문제를 피할 수 있다. 이에 따라 본 발명의 PTMT-T 세포는 COVID-19를 효과적으로 치료하고 관련 증상을 개선할 수 있다.

도면

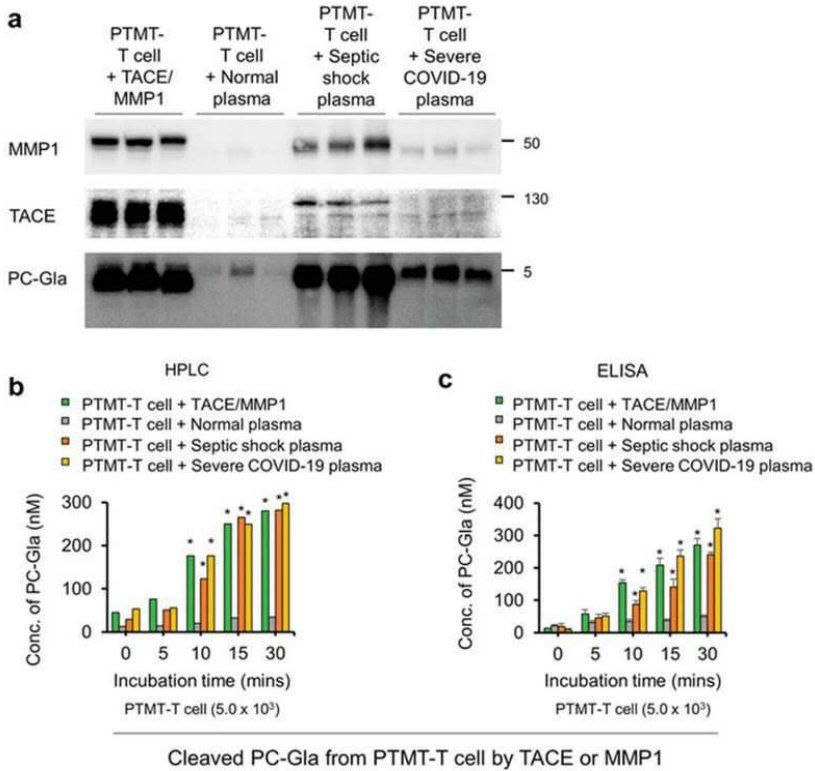
도면1



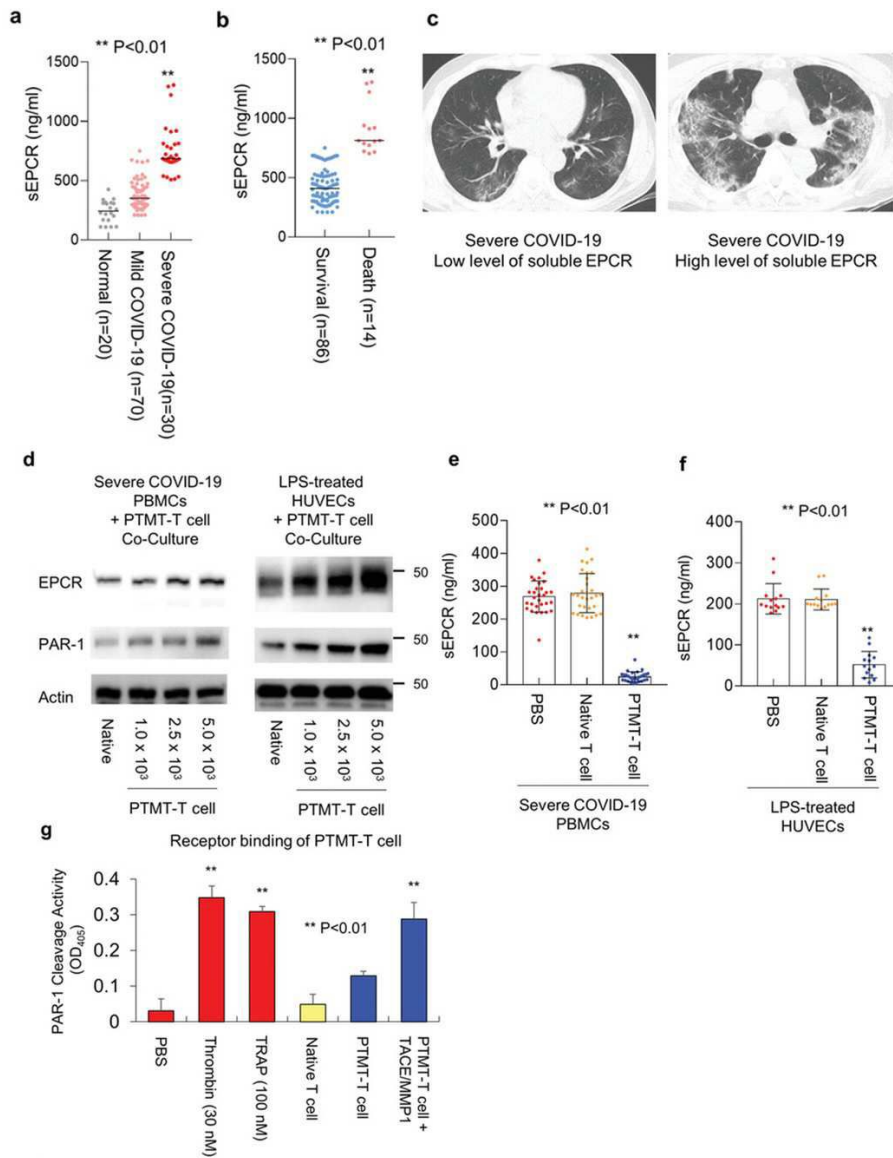
도면2



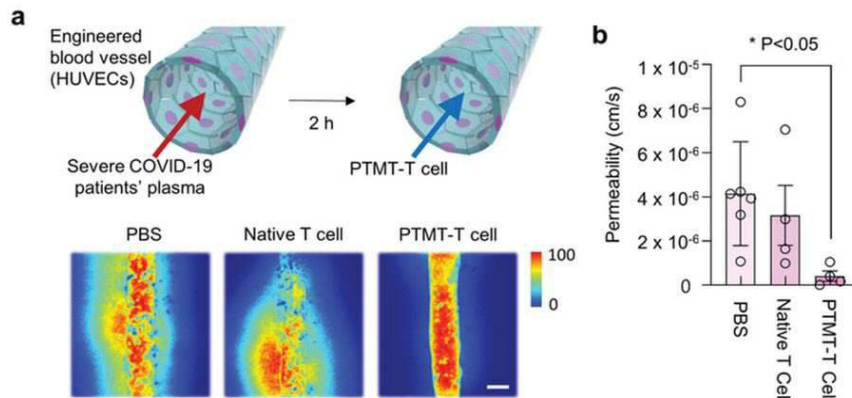
도면3



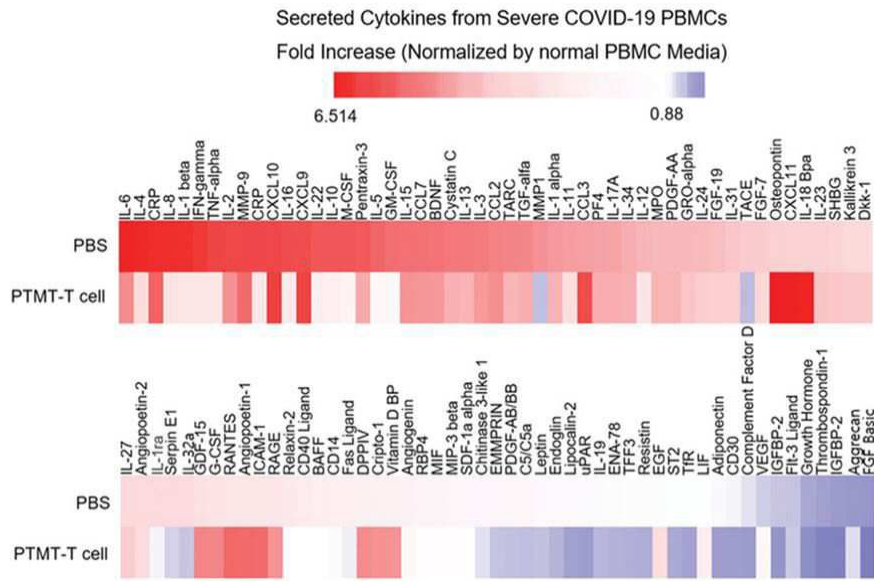
도면4



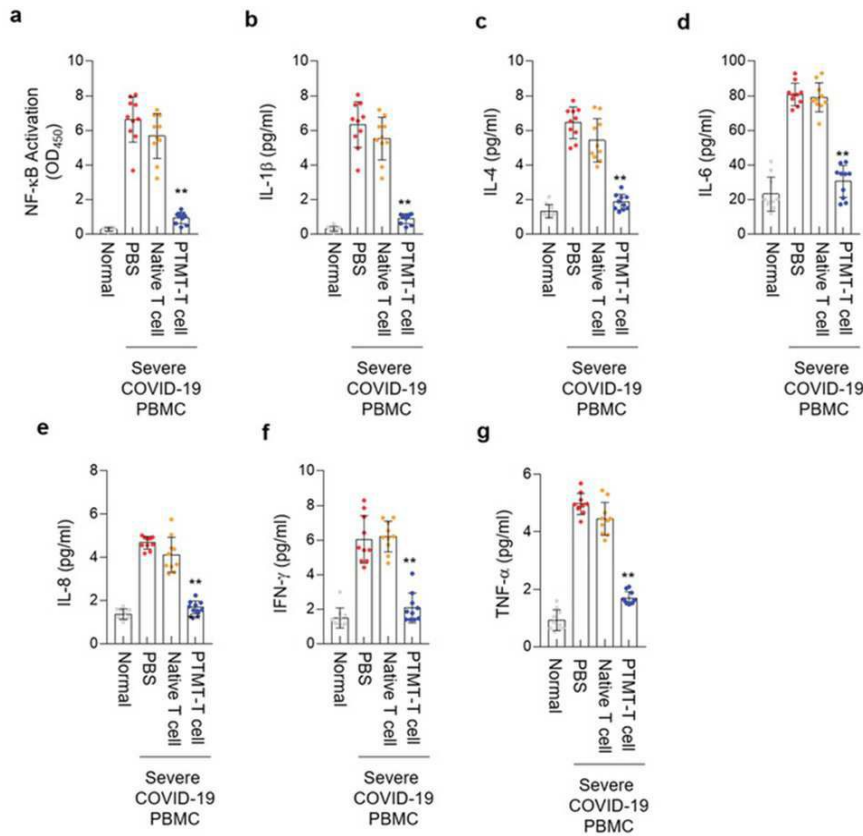
도면5



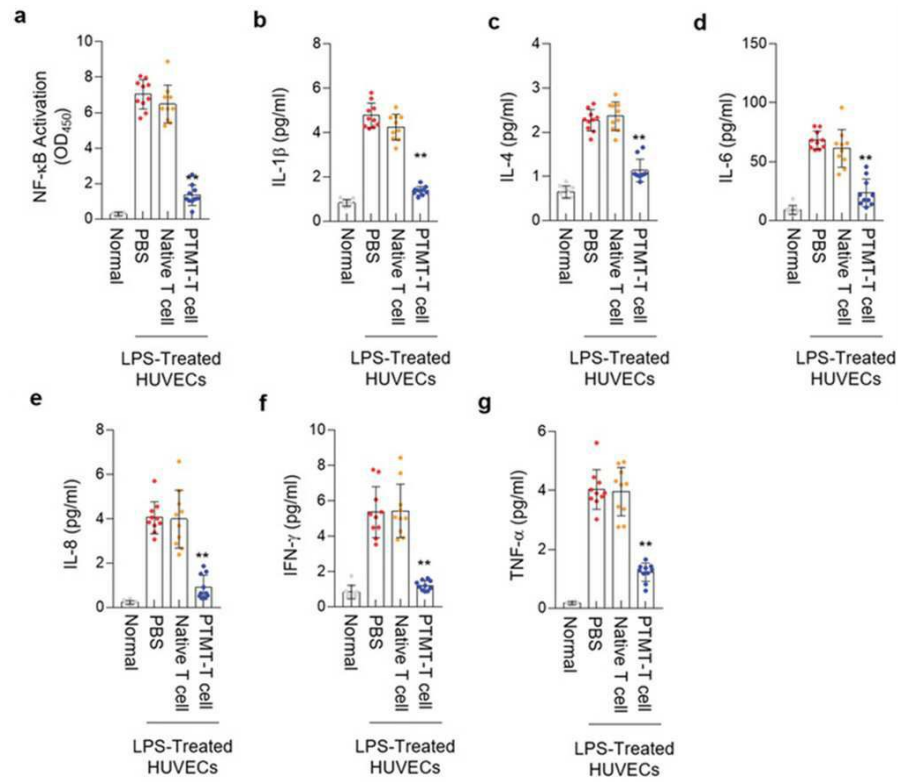
도면6



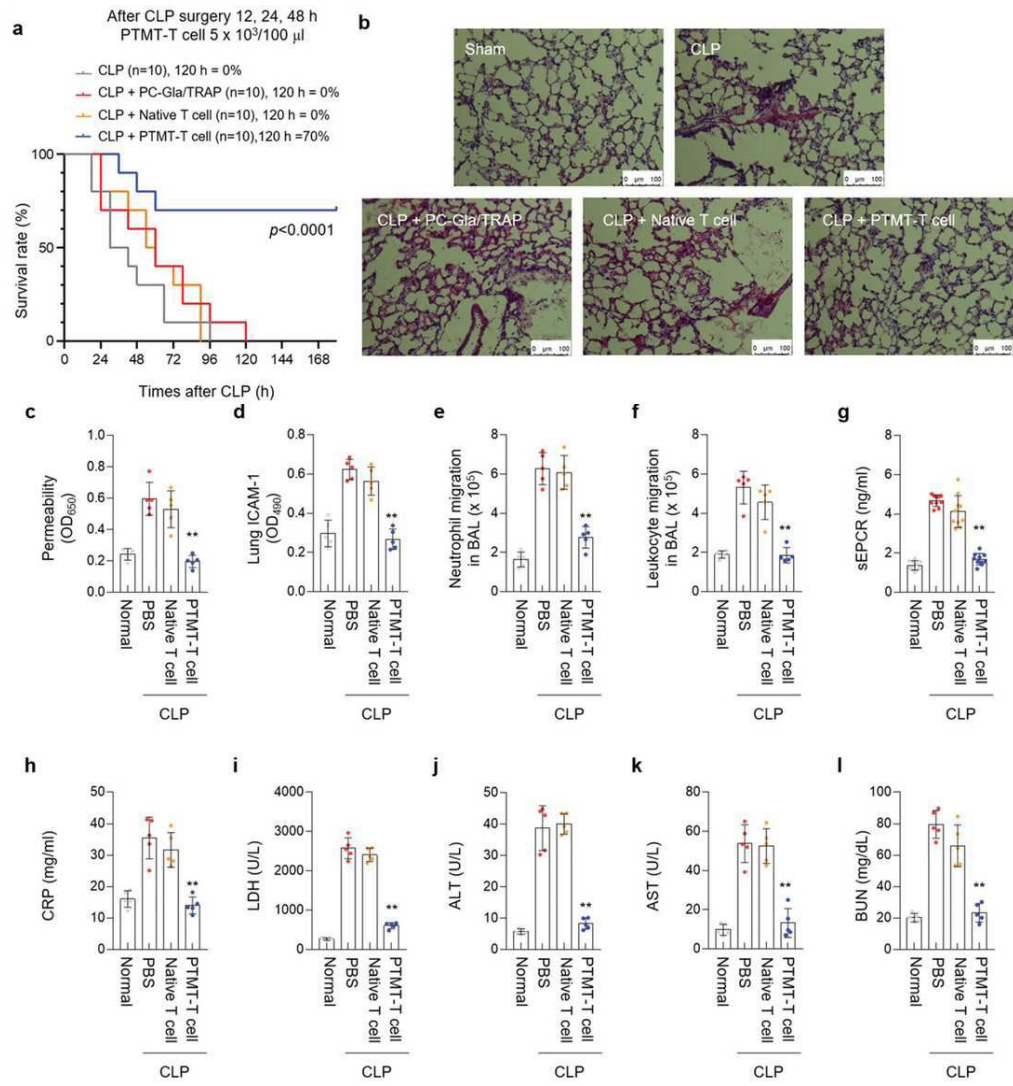
도면7



도면8



도면9



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.